

Entwicklungspotenz von embryonalen
Zellen und Kernen und von Zellen aus
Zellkultur bei *Drosophila melanogaster*

Martha Mertens

Diss
München
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Entwicklungspotenz von embryonalen
Zellen und Kernen und von Zellen aus
Zellkultur bei *Drosophila melanogaster*

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Martha Mertens
aus Kißlegg

Februar 1984

1. Berichterstatter Prof. Dr. Günter Korge
2. Berichterstatter PD Dr. Karl Moritz

Tag der mündlichen Prüfung 27. Juli 1984

Inhalt

1.	Einleitung	3
2.	Material und Methoden	5
2.1	Anlage und Etablieren der Zellkulturen	5
2.1.1	Anlage der Zellkulturen	5
2.1.2	Chromosomenanalyse	7
2.1.3	Wachstumskurven	7
2.1.4	Präparation der Zellen für Transplantationen	8
2.2	Transplantationen von Zellen aus Zellkulturen und von Zellen und Kernen aus Blastodermstadien	9
2.2.1	Vorbereitung der Drosophila-Eier	9
2.2.2	Instrumentierung	10
2.2.3	Durchführung der Transplantationen	11
3.	Ergebnisse	15
3.1	Zellkulturen	15
3.1.1	Differenzierung von Zellen in Primärkulturen	15
3.1.2	Die etablierten Zell-Linien und ihre Eigen- schaften	19
3.1.2.1	Morphologie	21
3.1.2.2	Chromosomenverhältnisse	28
3.1.2.3	Wachstum	31

3.2	Zell- und Kerntransplantationen am Ei	36
3.2.1	Ergebnisse der einzelnen Transplantationsserien	37
3.2.1.1	Transplantation von Präblastodermkernen	37
3.2.1.2	Transplantation von Blastodermzellen	41
3.2.1.3	Transplantation von Zellen aus Kultur	51
3.2.2	Auftreten von Defekten bei den einzelnen Transplantationsserien	56
3.2.3	Auftreten von Mosaikgewebe bei den einzelnen Transplantationsserien	62
3.2.3.1	Ansprechbarkeit von Mosaikgewebe	62
3.2.3.2	Mosaike nach Transplantation von Präblastodermkernen	65
3.2.3.3	Mosaike nach Transplantation von Blastodermzellen	69
3.2.3.4	Mosaike nach Transplantation von Zellen aus Kultur	89
4.	Diskussion	94
5.	Zusammenfassung	140
6.	Literaturverzeichnis	145

1. Einleitung

Die Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* ist typisch für nicht-regulative Mosaikkeime, bei denen das Schicksal großer Eibereiche sehr früh in der Entwicklung determiniert ist. Als dieses frühe Entwicklungsstadium wird allgemein der Zeitpunkt der Bildung des Blastoderms angesehen ($\sim 3 \frac{1}{2}$ h nach Eiablage), zu dem die in das Periplasma eingewanderten Kerne von Zellmembranen umgeben werden.

Chan und Gehring (1971) zeigten, daß Blastodermzellen aus der anterioren Eihälfte nur anteriore Larval- und Adultstrukturen bilden und daß Blastodermzellen aus der posterioren Eihälfte nur Strukturen der posterioren Körperhälfte liefern. Die Analyse von Zellklonen, die mittels Röntgenbestrahlung oder Ring-X-Chromosomenverlust in frühen Entwicklungsstadien des *Drosophila*-Eies induziert wurden, erbrachte indirekte Beweise dafür, daß die Nachkommen einer einzigen, genetisch markierten Blastodermzelle Segmentgrenzen nicht überschreiten (Ripoll, 1972; Merriam, 1978; Wieschaus, 1978; Garcia-Bellido und Ripoll, 1978). Wohl aber können Abkömmlinge ein und derselben Blastodermzelle an der Bildung verschiedener Organe innerhalb eines Segmentes beteiligt sein (Steiner, 1976; Wieschaus und Gehring, 1976; Lawrence und Morata, 1977).

Blastodermzellen sind demnach sicherlich nicht totipotent, wie es für Kerne aus Präblastoderm- und Gastrulastadien, die in Furchungsstadien transplantiert wurden, nachgewiesen wurde (Illmensee, 1972, 1973). Wie streng einzelne Blastodermzellen aber tatsächlich determiniert sind, läßt sich mittels der Analyse von induzierten Zellklonen schwerlich feststellen, da die Zellen der Klone in ihrer normalen Umgebung verbleiben. Eine geeignetere und deshalb für die vorliegende Arbeit gewählte Methode, die Frage, ob die Zellen stabil determiniert oder pluripotent sind, zu klären, ist die Transplantation von Blastodermzellen einer Region in andere Eiregionen genetisch markierter Empfängerembryonen. Hierbei werden einzelne oder kleine Gruppen von Blastodermzellen in eine andere, heterotope Ei-

region (meist) gleich alter Empfängerembryonen transplantiert, um dann die Differenzierung dieser Spenderzellen in einer fremden Umgebung zu verfolgen. Der Nachweis einer Integration im Empfängergerewebe und/oder einer autonomen herkunftsgemäßen Entwicklung erlaubt Aussagen über die Stabilität der Determination der Blastodermzellen.

Die Transplantation in frühe Entwicklungsstadien des *Drosophila*-Eies ist auch eine geeignete Methode, die Entwicklungspotenz von Zellen, die in Zellkultur gehalten werden, zu testen. Kerne von Zellen aus Kultur zeigen nach Transplantation in Furchungsstadien teilweise Integration im Empfängergerewebe (Illmensee, 1976, 1978). Wie weit dies auch für Zellen aus Kultur gilt, sollte mit Zellen neu angelegter Zell-Linien von *Drosophila melanogaster* untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Anlage und Etablieren der Zellkulturen

2.1.1 Anlage der Zellkulturen

Zur Anlage der Drosophila Zell-Linien wurden folgende Drosophila-Stämme verwendet:

y spl Samarkand (y = yellow 1-0.0, spl = split 1-3.0,
Lindsley und Grell, 1968)

z spl cv Träger der Duplikation $Dp(1;f)z^9$. C(1)RM, y v;
 $Dp(1;f)z^9$, z/ $\overline{X}\overline{Y}$, Df(1)sc^{J4R}, sc cv; $Dp(1;f)z^9$, z
(z = zeste 1-1.0, cv = crossveinless 1-13.7,
Lindsley und Grell, 1968)

Oregon (2/10) Wildstamm

Hikone Wildstamm

Die Tiere wurden im Thermostaten bei $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten und auf Standardfutter (Mais, Zucker, Hefe, Agar) gezogen.

Die Drosophila Zell-Linien wurden aus homogenisierten Embryonen angelegt. Eine Woche alte Fliegen wurden zur Eiablage auf Futterschälchen gesetzt, die anstelle des normalen Futters mit Agar gefüllt und mit autoklavierter Hefe bestrichen waren. Die Gelege von 3 - 6 Stunden wurden 8 - 12 Stunden, in einigen Fällen nur ca. 5 Stunden, bei 25°C inkubiert.

Die Eier wurden mit konzentrierter Zuckerlösung abgewaschen, bereits geschlüpfte 1. Larven wurden aussortiert. Nach Spülen mit Aqua dest. wurden die Eier in 2.5% Na-Hypochlorit-Lösung entchorionisiert (7 min). Ab hier mußte unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Die entchorionisierten Embryonen wurden in ein steriles Drahtnetz abgegossen und mit sterilem Aqua bidest. und anschließend mit Saline (nach Chan u. Gehring, 1971) mehrmals gespült. Zur Homogenisation wurden sie mit Medium M3 (Shields & Sang, 1977) in einen Glas-Homogenisator (Clearance 0,2 mm; Jencons, Hempstead, Engl.) geschwemmt und nach nochmaligem Spülen in ca. 3 ml Medium M3 mit 3 kräftigen Drehungen des Teflonstempels homogenisiert. Um die Fragmente der Vitellarmembranen und gelegentlich nicht homogenisierte Embryonen zurückzuhalten, wurde das Homogenat durch ein steriles Nylonnetz (105 μm Porenweite) in 16 ml Zentrifugenröhrchen

filtriert. Zentrifugiert wurde bei 200 g (1200 U/min) für 10 min. Das Sediment wurde in 12 ml Saline aufgenommen, erneut zentrifugiert und noch drei weitere Male in Saline gewaschen, um Dottermaterial und Bruchstücke von Zellen zu entfernen. Zum Schluß wurde das Sediment mit ca. 8 ml Medium M3 aufgenommen und ein letztes Mal zentrifugiert. Zuvor wurde eine Probe zur Titerbestimmung entnommen und im Haemocytometer ausgezählt. Entsprechend dem gewünschten Zelltiter wurden die sedimentierten Zellen mit Medium M3 aufgenommen und in Plastikflaschen (25 cm² Wachstumsfläche, Corning) ausgesät. Plattiert wurde mit einer Dichte von 1.5 - 2·10⁶ Zellen/ml in ca. 4 ml Medium.

Das Füttern der Zellen mit frischem Medium erfolgte für die ersten 3- 4 Wochen in 3 - 4 tägigem Abstand, danach einmal wöchentlich. Dabei wurde ca. 1/3 des alten Mediums abgegossen und durch frisches Medium ersetzt. Wenn Einzelzellen und Zellklumpen im Überstand in größerer Zahl auftraten, wurde das abgegossene Medium auf Nunc-Röhrchen (Nunc-Zellkulturröhrchen mit ebenem Boden, Wachstumsfläche ~ 11 cm²) transferiert. Aus diesen Transfers entstanden häufig Unterlinien. Hatte die Proliferation der Zellen in den Stammflaschen zu konfluenten Kulturen geführt, wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren abgelöst und 1 : 1 verdünnt und neu plattiert.

Das zum Ansetzen benutzte Medium M3 (Shields & Sang, 1977) wurde für alle Kulturen verwendet. Das Medium mit einem pH-Wert von 6.8 wurde mit 10% fetalem Rinder-Serum (hitze-inaktiviert, 30 min bei 56°C) supplementiert. Sterilfiltration erfolgte durch Gelman-Filter, 0.22 µm Porenweite. Das Medium enthielt keine Antibiotika. Die Zellkulturen wurden bei 25°C gehalten. Beim routinemäßigen Umsetzen der Zellen wurden die konfluenten Kulturen durch vorsichtiges Pipettieren von der Unterlage abgelöst und in neuen Corning-Flaschen mit frischem Medium in der gewünschten Dichte ausgesät. Die stabilen Zellkulturen wurden in 2 - 4 wöchigem Abstand passagiert, abhängig von der Wachstumsrate der einzelnen Linien und Sublinien. Langsam wachsende Kulturen wurden auch zwischen den Passagen durch teilweisen Austausch des Mediums gefüttert. Schlecht wachsende Kulturen wurden über 5 - 7 Tage mit 10 µg/ml Vibramycin (Pfizer, Zürich) behandelt.

2.1.2 Chromosomenanalyse

Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden einen Tag vor der Präparation durch Mediumaustausch zu verstärktem Wachstum angeregt. Eine Stunde vor dem Ernten der Zellen wurde der Mitosehemmer Vinblastinsulfat (Sigma) zugegeben (Endkonzentration $2.5 \mu\text{g/ml}$); die Zellen wurden durch Pipettieren geerntet, zentrifugiert (800 U/min, 8 min) und resuspendiert in 0.1 % Na-Citrat, um eine Quellung zu erreichen (hypotonische Behandlung 20 min bei 25°C). Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, fixiert mit Methanol : Eisessig 3 : 1 (10 min) und nach der Zentrifugation ein zweites Mal mit frischer Fixierlösung behandelt. Das Zell-Pellet nach der letzten Zentrifugation wurde in einigen Tropfen 40 % Essigsäure aufgenommen und auf vorgewärmte ($40 - 45^{\circ}\text{C}$) saubere Objektträger aufgespritzt und an der Luft getrocknet. Die Präparate wurden gefärbt mit Orcein in Milchsäure : Eisessig 1 : 1 und unter Phasenkontrast ausgewertet und fotografiert.

2.1.3 Wachstumskurven

Das Wachstum der Kulturen wurde verfolgt

- a) durch Auszählen der auf dem Plastikboden der Flaschen wachsenden Zellen des Zellrasens mit Hilfe eines Okularnetzes und
- b) durch Auszählen der geernteten Zellen im Haemocytometer. Die Zellen wurden durch 10-minütige Behandlung mit 2.5 % Trypsin (Gibco) in PBS (Phosphat-gepufferte Saline) von der Unterlage abgelöst.

Die erste Methode ergab zuverlässige Daten in der ersten Hälfte der Wachstumsperiode, solange die Zellen nicht zu dicht in Haufen und Netzen zusammenwuchsen. Die zweite Methode war zuverlässiger in der zweiten Hälfte der Wachstumsperiode, da die Zellen aufgrund ihrer starken Haftung auf der Unterlage sich in den ersten Tagen nach dem Umsetzen selbst nach Trypsinbehandlung meist nicht quantitativ ernten ließen. Der Neuanatz einer Kultur wurde nach beiden Methoden ausgezählt, um den Umrechnungsfaktor zu gewinnen (100 Zellen im Okularnetz entsprachen einem Titer von $3.5 \cdot 10^5$ Zellen/ml).

2.1.4 Präparation der Zellen für Transplantationen

Für die Transplantationen in frühe Entwicklungsstadien des Eies wurden nur Zellkulturen ausgewählt, die gleichmäßiges gutes Wachstum zeigten. Die Kulturen wurden im letzten Teil der exponentiellen Wachstumsphase durch Mediumaustausch zu verstärktem Wachstum angeregt. Anderntags wurde der Überstand, der gewöhnlich sehr viele Zellen enthielt, auf kleine Plastik-Petrischalen (Nunc 3.5 cm Ø) gegossen; 2 Stunden später, nachdem die Zellen sich auf dem Boden der Petrischalen festgesetzt hatten, wurde das alte Medium durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen unmittelbar vor dem Transplantationsexperiment 5 - 6 mal durch vorsichtiges Absaugen des alten und Zugabe von je 2 ml frischen Mediums gewaschen. Zum Schluß wurden 2 - 4 Tropfen Medium auf den Zellrasen gegeben, und durch leichtes Klopfen wurden die Zellen abgelöst; sie ergaben im allgemeinen eine Zellsuspension von $1 - 3 \cdot 10^6$ Zellen/ml, von der ein kleiner Tropfen (ca. 4 μ l) auf die Objektträgerwanne neben die vorbereiteten Eier gegeben wurde. Anschließend wurden Eier und Zellsuspension mit sterilisiertem Paraffinöl abgedeckt.

2.2 Transplantationen von Zellen aus Zellkulturen und von Zellen und Kernen aus Blastodermstadien

2.2.1 Vorbereitung der Drosophila-Eier

Für die Versuche verwendete ich die beiden *Drosophila melanogaster* Stämme mwh e (mwh = multiple wing hairs 3-0.0, e = ebony 3-70.7, Lindsley und Grell, 1968) als Spenderstamm, und y w f^{36a} mal (y = yellow 1-0.0, w = white 1-1.5, f^{36a} = forked 1-56.7, mal = maroon-like 1-64.8, Lindsley und Grell, 1968) als Empfängerstamm. Die Tiere wurden im Thermostaten bei 25°C $\pm$ 1°C auf Standardfutter (Mais, Zucker, Agar, Hefe) gezogen.

Zum Ablegen der Eier verwendete ich Tiere, die mindestens 3 Tage alt waren und 1 Stunde nach dem Umsetzen auf frisches Futter gute Eiablage zeigten. Danach wurden die Tiere auf Ablageschälchen gesetzt. Die erste Ablage (1 h) auf den Ablageschälchen wurde verworfen, da sie allgemein einen hohen Anteil an bereits weiter entwickelten Eiern aufwies. Die Ablage der Eier erfolgte jeweils über 1 h bei 25°C $\pm$ 1°C. Für y w f^{36a} mal Eier, die als Empfänger im Furchungsstadium verwendet werden sollten, erfolgte die Eiablage nur über 30 min bei 25°C $\pm$ 1°C. Die an die Ablage anschließende Inkubation dauerte 0 - 2 h bei 25°C je nach Versuch. Die weiteren Vorbereitungen wurden bei 20°C $\pm$ 1°C vorgenommen.

Die Spender- und Empfängereier wurden unter dem Stereomikroskop abgesammelt, in 70 % Äthanol kurz gewaschen und mechanisch entchorionisiert in sterilem Aqua bidest, dem 10 mg Penicillin und 10 mg Streptomycin pro 100 ml zugesetzt waren. Die entchorionisierten Eier wurden in 2 getrennten Gruppen von je ca. 30 Eiern auf eine sterilisierte Objektträgerwanne transferiert und 10 min im Exsiccator bei 20°C über Trockenperlen getrocknet, um den hohen Binnendruck der Eier zu senken. Unter diesen Bedingungen getrocknete Eier zeigten während der Transplantation nur selten einen Eimaterialverlust, der dann gering war. Nach dem Trocknen wurden die Eier mit sterilisiertem Paraffinöl (Merck) bedeckt und orientiert. Unbefruchtete Eier und Eier, die sich schon über das Blastodermstadium hinaus entwickelt hatten, wurden entfernt. Die frühen

Entwicklungsstadien sind unter dem Stereomikroskop selbst bei geringer Vergrößerung gut zu erkennen. Unter dem Mikroskop lassen sich die Einwanderung der Kerne in das Eiperiplasma, die Abgrenzung der Polzellen und die Bildung des Blastoderms sehr gut verfolgen. Insbesondere das Stadium des zellulären Blastoderms mit dem äußeren dichten Ring von Zellen, gegen den Dotter abgegrenzt durch basal gebildete Membranen, ist eindeutig anzusprechen.

Befanden sich Spender- und Empfängereier im gewünschten Stadium, erfolgte die Transplantation. Bei den meisten Versuchen war dies das zelluläre Blastoderm, ca. 3,5 h nach Eiablage.

2.2.2 Instrumentierung

Für die Transplantation von Blastodermzellen und -kernen wurden Kanülen mit einem Innendurchmesser von 10 - 12 μm , für die von Zellen aus Kultur wurden Kanülen von 6 - 8 μm Innendurchmesser verwendet. Auf einem Schleifgerät mit rotierender Metallplatte, dünn bestrichen mit Diamantpaste (0.25SS, Winter, Hamburg) wurden die Kanülen etwa im 20° Winkel zur Längsachse angespitzt. Die Kanülen wurden dann mit conc. Schwefelsäure von Schleifpaste gereinigt und silikonisiert. Das Silikonisieren erfolgte nach einer geringfügig abgewandelten Methode von Gräßman (1970) - kurzes Aufziehen und sofortiges Ausblasen von 10% Flußsäure, mehrmaliges Spülen mit Aqua bidest., Aufziehen und Ausblasen von Alkohol, Tetrahydrofuran (Merck) und 3% Dichlordimethylsilan (Merck) in Tetrahydrofuran in der Reihenfolge: 2 x Äthanol, 1 x Methanol, 1 x Tetrahydrofuran, 1 x 3% Dichlordimethylsilan in Tetrahydrofuran, 1 x Tetrahydrofuran, 1 x Methanol, 2 x Äthanol. Die silikonisierten Kanülen wurden bei 150°C 2 h sterilisiert und unter einem Glassturz aufbewahrt.

Zur Transplantation wurde eine der silikonisierten Kanülen mit einem mit Voltalef S3 Öl (Lehmann & Voss, Hamburg) gefüllten Spritzensystem verbunden, das mittels einer an einen Feintrieb angeschlossenen, gasdichten Spritze (Hamilton, 0.250 ml) kontrolliert wurde. Die Kanüle wurde über einen Mikromanipulator (Leitz) bewegt.

Eine Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von ca. 50 μm und einem Außendurchmesser von ca. 250 μm wurde aus einem dickwandigen Glasrohr hergestellt (Ansaugkapillare). Diese zum Festhalten der Eier bestimmte Kapillare wurde nicht silikonisiert. Sie wurde an einen mit Paraffinöl gefüllten Saugapparat angeschlossen und über einen zweiten Mikromanipulator bewegt. Die Transplantationen führte ich unter einem Mikroskop mit UM Objektiven (Zeiss) der Vergrößerung $\times 500$ durch.

2.2.3 Durchführung der Transplantationen

Entchorionisierte und getrocknete mwh e Spender- und y w f^{36a} mal Empfängerembryonen waren in zwei Reihen auf einer Objektträgerwanne unter Paraffinöl orientiert. Mit Hilfe der Ansaugkapillare wurde das Spenderei an der Ansaugkapillare in der gewünschten Position gehalten. Die an das Ei herangeführte Transplantationskanüle (10 - 12 μm im Innendurchmesser) wurde nun an der vorgesehenen Stelle in das Blastoderm eingeführt und die Blastodermzellen bzw. -kerne wurden langsam in die Kanüle aufgesaugt. Bei Versuchen, in denen Vorder- bzw. Hinterpol als Spenderregionen dienten, zeigte die Kanülenöffnung zur Peripherie des Eies (siehe Abb. 1a); dienten andere Eibereiche als Spenderregion, so wurde die Kanüle so weit in das Ei eingeführt, daß aus dem der Anstichstelle gegenüberliegenden Blastodermbereich Zellen abgesaugt werden konnten (siehe Abb. 1b); dies, um möglichst wenig Dottermaterial mit aufzunehmen. Es wurden durchschnittlich ca. 30 Zellen bzw. Kerne aufgezogen.

Abbildung 1: Transplantation von Zellen und Kernen



a) mwh e Spender,
Zellentnahme
am Vorderpol

b) mwh e Spender,
Zellentnahme in
0.66 Eilänge,
lateral

c) y w f^{36a} mal Empfänger,
Zellinjektion in den
Hinterpol

Transplantationskanüle und Ansaugkapillare wurden nun an ein y w f^{36a} mal Empfängerei herangeführt, und das Ei wurde mittels der Ansaugkapillare festgehalten. Die Transplantationskanüle mit den Zellen oder Kernen wurde vorsichtig in das Ei an der gewünschten Region eingeführt und zwar nur so weit, daß sich die Kanülenöffnung gerade innerhalb der Vittellarmmembran befand. So wurde sichergestellt, daß die injizierten Zellen oder Kerne peripher zwischen den Blastodermzellen oder Kernen des Empfängers zu liegen kamen (Abb. 1c). Es wurden 4 bis 8 Zellen bzw. Kerne injiziert. Danach wurde die Kanüle langsam aus dem Ei zurückgezogen. Ein Abdichten der Wunde war nicht erforderlich, da bei Eiern, die nach oben beschriebener Methode getrocknet waren, kaum Eimaterial verloren ging. Mit den restlichen Zellen bzw. Kernen in der Kanüle wurden weitere 3 bis 5 y w f^{36a} mal Empfängereier nach derselben Methode injiziert.

In Versuchen, in denen Zellen aus Zellkultur als Spender dienten, betrug der Innendurchmesser der Transplantationskanüle nur 6 - 8 µm, weil die Zellen einen geringeren Durchmesser als die Blastodermzellen besitzen und möglichst wenig Medium mit injiziert werden sollte. Die Kanüle wurde in den Tropfen Zellsuspension eingeführt; 1 - 3 Zellen wurden vorsichtig in die Spitze aufgezogen und sofort in den Hinterpol von y w f^{36a} mal Empfängereiern injiziert. Als Empfänger dienten Eier im Präblastodermstadium. Die Transplantationen erfolgten bei 18 - 20°C.

Nach Beendigung der Transplantation wurden die mwh e Spender-eier und y w f^{36a} mal Eier, die nicht als Empfänger verwendet worden waren, vom Objektträger entfernt. Die Empfängereier wurden beobachtet, bis die ersten morphogenetischen Vorgänge, z.B. die Bildung der hinteren Mitteldarmanlage und die Verlängerung des Keimstreifs, zu erkennen waren; anschließend wurden sie bei 25°C gehalten.

Am Tage nach der Transplantation wurden die Embryonen, die sich normal entwickelt hatten, kurz vor dem Schlüpfen aus dem Paraffinöl in Ringer-Lösung (Ephrussi und Beadle, 1936) überführt, geschlüpfte 1. Larven wurden in kleine Röhrchen auf Standardfutter gebracht. Embryonen, die sich nicht ent-

wickelt hatten, sowie geschlüpfte Larven, die Defekte aufwiesen, wurden getrennt registriert.

Bis zum 3. Larvenstadium wurden die Larven täglich beobachtet und gefüttert. Larven, die verlangsamtes Wachstum und/oder sonstige Anomalien zeigten, wurden im 2. bzw. 3. Larvenstadium getötet und untersucht. Die übrigen Tiere wurden im 3. Larvenstadium zur Metamorphose auf Futterröhrchen mit Standardfutter gesetzt.

Die geschlüpften Fliegen wurden auf Mosaikgewebe hin untersucht. Defekte wurden ebenfalls registriert. Chitinöse Strukturen wurden zwischen 2 Deckgläschen in Faure's Einbettungslösung (10 ml Glycerin, 15 g Gummi arabicum (Merck), 25 ml Chloralhydrat (Merck), 25 ml Aqua dest.) eingebettet. Vor Untersuchung der inneren Organe wurden die Fliegen 3 h auf feuchtes Filterpapier gesetzt, um den Verdauungstrakt von Nahrungsresten zu entleeren; anschließend wurden sie in kalter Ringer-Lösung geöffnet und auf Aldehyd-Oxidase getestet.

Aldehyd-Oxidase-Test (Janning, 1976): Fixierung in eiskaltem 1% Glutaraldehyd in Ringer-Lösung, 30 min; 3 x Spülen in eiskalter Ringer-Lösung, 30 min; Färbung in Reaktionsgemisch aus
 1 ml NBT (Nitroblautetrazolium, 5 mg/ml p-NBT Chlorid (Serva))
 2 ml Tris-HCl Puffer (0.2 M, pH 8.0)
 0.2 ml PMS (2mg/ml Phenazin-Methosulfat (Serva))
 0.1 ml EDTA (0.01 M)
 0.01 ml Benzaldehyd, 15 min bei Zimmertemperatur;
 Fixierung in Äthanol : Eisessig = 3 : 1, 10 min.

mal⁺ Gewebe, das Aldehyd-Oxidase-Aktivität aufweist, färbt sich tief-dunkelblau an (Reduktion von NBT), während mal Gewebe, das keine Aldehyd-Oxidase-Aktivität aufweist, ungefärbt bleibt. Von mal⁺ Spendern stammende Zellen lassen sich daher in allen inneren Geweben, die im Wildtyp Aldehyd-Oxidase-Aktivität zeigen, im mal Empfänger als Mosaikflecken leicht nachweisen. Zur Untersuchung wurden die Präparate in 45% Essigsäure überführt. Mosaikgewebe wurde zwischen 2 Deckgläschen in Faure's Einbettungslösung eingebettet.

Es wurden drei Kontrollserien durchgeführt; in Serie A wurden y w f^{36a} mal Eier entchorionisiert und getrocknet nach oben beschriebener Methode und mit Ausnahme der Transplantation gleich behandelt wie die Experimenttiere.

In Serie B wurden die entchorionisierten und getrockneten Eier mit einer Transplantationskanüle am Hinterpol angestochen (Furchungs-Stadium), ohne Eimaterial zu injizieren oder abzusaugen. Die weitere Behandlung glich der der Experimenttiere.

In Serie C wurden die y w f^{36a} mal Eier ebenfalls nach oben beschriebener Methode entchorionisiert und getrocknet. Unter Paraffinöl wurde ihnen dann Zellkultur-Medium M3 in den Hinterpol im Präblastodermstadium injiziert in einer Menge, die dem Volumen von ~ 10 Zellen aus Kultur entsprach. Die weitere Behandlung war gleich der für die Experimenttiere.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkulturen

3.1.1 Differenzierung von Zellen in Primärkulturen

Das Auftreten verschiedener Zelltypen und ihre Differenzierung in Primärkulturen, die aus *Drosophila melanogaster* Embryonen gewonnen worden waren, wurde von Shields und Sang (1970) und von Shields et al. (1975) beschrieben. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angelegten Zell-Linien zeigten ähnliche Verhältnisse im Verlauf der Entwicklung der Primärkulturen.

Bei den einzelnen Ansätzen waren Unterschiede bezüglich der Entwicklung der Primärkulturen zu beobachten, zum Teil abhängig vom Dissoziationsgrad des Ausgangsmaterials und von der Zelldichte beim Ansatz der Kultur. Eine weitgehende Dissoziation der Embryonen - d.h. Vorhandensein vieler intakter Einzelzellen - und eine große Zelldichte begünstigten im allgemeinen die Entwicklung einer Primärkultur. Eine Rolle hierbei mag auch der noch im Medium verbliebene Anteil an Dottermaterial gespielt haben, dem lytische Aktivität zugesprochen wird (Bernhard et al., 1980). Mehrmaliges Spülen der Zellsuspension mit Saline zur Entfernung von möglichst viel Dottermaterial erwies sich als sehr vorteilhaft für die Entwicklung einer Primärkultur.

Shields et al. (1975) beschrieben mehrere Zelltypen, die innerhalb von einem bis wenigen Tagen nach Ansatz in der Kultur zu beobachten waren. Ein sehr auffallender Zelltyp, der regelmäßig und in großer Zahl bereits 12 - 24 h nach Ansatz in der Kultur zu identifizieren war, war der der Nervenzellen. Es waren kleine Zellen, deren Kern von nur wenig Cytoplasma umgeben war und die einen oder mehrere lange Cytoplasmafortsätze besaßen. Diese Fortsätze konnten einfach oder verzweigt sein und, wenn mehrere Nervenzellen benachbart lagen, sehr komplexe Netze bilden (Abb. 2). Vornehmlich in dichten Kulturen konnten diese aus Nervenzellen gebildeten Netze nach 4 - 5 Tagen einen extremen Grad an Komplexität erreichen. Zusammen mit den Muskelzellen bildeten sie zu diesem Zeitpunkt ein reich verzweigtes System an differenzierten larvalen Zellen.

Die Muskelzellen waren ebenfalls bereits nach 12 - 24 h Inkubation in der Kultur zu beobachten. Es waren lange spindelförmige Zellen, die einen großen Kern mit einem gut zu erkennenden Nucleolus hatten und an beiden Enden Fortsätze trugen. In wenigen Tagen alten Kulturen formten sie häufig zusammenhängende Zellgeflechte, die sich stark kontrahierten. Manche der Muskelzellen schienen zwei oder mehrere Kerne zu besitzen (Abb. 3). Muskelkontraktion konnte in guten Primärkulturen bis zu 4 Wochen nach Ansatz beobachtet werden. Ab dem Ende der 3. Woche begannen die Muskelzellgeflechte im allgemeinen zu degenerieren.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen beiden Zelltypen waren differenzierte Fettzellen erst ab dem 5. bis 7. Tag nach Ansatz in der Kultur zu verfolgen. Es waren große Zellen, die dicht mit Fett-Tröpfchen gefüllt waren und in einer 8 - 10 Tage alten Primärkultur sehr auffielen. Die Fettzellen lösten sich leicht von der Wachstumsfläche ab und gingen innerhalb von 2 - 3 Wochen nach Ansatz beim Mediumaustausch und durch Degeneration verloren.

Ein weiterer in Primärkulturen zu beobachtender Zelltyp waren Makrophagen-ähnliche Zellen - große Zellen mit einem zentral gelegenen Kern, der einen deutlich zu erkennenden Nucleolus besaß. Der äußere Cytoplasmasaum erschien meist klar, der innere Cytoplasmabereich war granulär (Abb. 2; 4). Die im Vergleich zu den drei zuvor beschriebenen Zelltypen seltener auftretenden Makrophagen-ähnlichen Zellen sollten laut Shields et al. (1975) den larvalen Haemocyten entsprechen und zu den multiplikativen Zelltypen gerechnet werden, da die Entstehung von Zellkolonien aus einzelnen dieser Zellen verfolgt werden konnte.

In einigen Primärkulturen waren 4 - 6 Tage nach Kulturansatz kleine hohle Zellvesikel zu beobachten, die aus 10 - 20 Zellen bestanden, die die Hülle des Vesikels bildeten. Diese Vesikel ähnelten den von Dübendorfer et al. (1975) beschriebenen und in Transplantationsexperimenten getesteten imaginalen Vesikeln, die nach Implantation in Larven des dritten Larvenstadiums erkennbare adulte Strukturen mit Borsten und Haaren bildeten. Diese Vesikel verschwanden meist nach ca. 2 Wochen aus der Kultur, ohne extensiv proliferiert zu haben.

Die von Shields et al. (1975) ebenfalls genannten Chitin-sezernierenden Zellen und Tracheenzellen konnten in den hier angelegten Primärkulturen nur vereinzelt beobachtet werden. Shields et al. beschrieben diese beiden Zelltypen als sehr empfindlich auf nicht optimale Kulturbedingungen reagierend. Möglicherweise entsprachen die Kulturbedingungen in den hier angelegten Primärkulturen nicht denen, die für die Differenzierung von Chitin-sezernierenden Zellen und von Tracheenzellen erforderlich gewesen wären. Die von Shields et al. beschriebenen Primärkulturen waren als Tropfenkulturen in Deckglasvertiefungen angelegt worden im Gegensatz zu den eigenen Kulturen, die sich in Plastikflaschen entwickelten.

Etwa 1 Woche nach Ansatz einer Kultur hatten sich alle als larvale Zelltypen identifizierbaren Zellen differenziert; in einer 2 Wochen alten Primärkultur waren bereits die ersten Zeichen von Degeneration und Abbau der differenzierten Zellen zu erkennen, häufig begleitet von einer starken Melanisierung der absterbenden Zellen. Einige andere, vermutlich undifferenzierte Zellen zeigten zur gleichen Zeit eine zunehmende Proliferation. Aus diesen Zellen entstanden später die stabilen Zell-Linien.

Nach dem äußeren Erscheinungsbild ließen sich die sich vermehrenden Zellen zwei Typen zuordnen: Fibroblasten-ähnlichen Zellen und Epithelzellen. Zum Teil traten auch Gruppen gleichmäßig runder Zellen auf. Als Fibroblasten-ähnliche Zellen wurden länglich-spindelförmige Zellen angesprochen, die einen oder mehrere Fortsätze trugen (Abb. 5). Die Epithelzellen waren flache polygonale Zellen mit granulärem Cytoplasma (Abb. 4). Beide Zelltypen enthielten augenfällige Nucleoli. Sowohl Epithelzellen als auch Fibroblasten-ähnliche Zellen bildeten mit fortschreitendem Alter der Kultur große Kolonien, die besonders bei den Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus mehreren Zell-Lagen und komplex geformten Netzen bestanden.

Bei älteren Kulturen löste sich meist ein Teil der Zellen von der Unterlage ab und schwamm frei im Medium. Waren im Überstand sehr viele Zellen und Zellhaufen zu finden, so wurde der Über-

stand beim Mediaumaustausch ohne weitere Verdünnung auf Nunc-Röhrchen gegeben und, falls Zell-Proliferation zu beobachten war, im gleichem Rhythmus wie die Ausgangsflasche (alle 5 - 6 Tage) mit ca. $1/3$ frischem Medium versetzt. Die mit N bezeichneten Unterlinien entstanden aus diesen auf Nunc-Röhrchen gegebenen Überständen.

Hatten sich die Zellkolonien in der Ausgangsflasche oder in den Nunc-Röhrchen so stark vermehrt, daß sie einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten, wurden die Zellen zum ersten Mal passagiert. Dafür wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren von der Unterlage abgelöst, die Zellsuspension wurde 1 : 1 mit frischem Medium verdünnt und zu gleichen Teilen auf zwei neue Kulturflaschen verteilt. Bei den folgenden Passagen wurden die Zellen im allgemeinen mit einem Titer von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml angesetzt, die Ausgangs-Zellsuspension wurde entsprechend dem gewünschten Titer mit frischem Medium verdünnt. Der Mindesttiter, der erforderlich war, damit eine Proliferation der Zellen noch einsetzen konnte, lag bei ca. $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml; bei einer darunter liegenden Zelldichte wuchsen die Zellen sehr langsam bzw. stellten ihre Teilungsaktivität ein.

In einigen Fällen ($2/10_1$ und $2/10_2$) mußten die Stammkulturen aufgegeben werden, bevor sich ein zusammenhängender Zellrasen gebildet hatte, da die Kulturansätze übermäßig melanisierten und das Wachstum einstellten. Die stabilen Linien entstanden in diesen Fällen aus den zuvor gewonnenen Überständen.

3.1.2 Die etablierten Zell-Linien und ihre Eigenschaften

Tabelle 1: Liste der etablierten Zell-Linien

Zell-Linie	Unterlinien	Stamm	Alter der Embryonen	Ansatz d.Kultur	1.Passage	Monate bis zur 1.Passage	Passagen bis 10/81	Monate pro Mon.	Passagen pro Mon.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sa ₁	N ₂ , N ₄	Samarkand y spl/Sa	11-17 h	1/79	4/79	3	47	30	1.6
Sa ₂	N ₁ , N ₄	Samarkand y spl/Sa	13-16 h	1/79	6/79	5	46	28	1.6
z spl ₁	C ₁ , N ₅ ^F N ₆	Duplikation z spl cv	13-17 h	1/79	8/79	7	44	26	1.7
Hi ₁	N ₄ , N ₆	Hikone	13-18 h	3/79	11/79	8	44	23	1.9
Hi ₂	N ₄ , N ₈	Hikone	6-15 h	7/79	11/79	4	33	23	1.4
Hi ₃	N ₄ , N ₆ N ₇ , N ₈	Hikone	10-16 h	9/79	2/80	5	35	20	1.75
2/10 ₁	N ₁ , N ₂ N ₃	Oregon	6-15 h	6/79	10/79	4	34	24	1.4
2/10 ₂	N ₂	Oregon	6-15 h	6/79	11/79	5	34	23	1.5
2/10 ₃	C ₁ , N ₂ N ₄	Oregon	6-8 h	8/79	2/80	6	28	20	1.4
2/10 ₄	C ₁ , N ₂	Oregon	5-7 h	8/79	2/80	6	27	20	1.35
Mittel						5.3	37	23.6	1.57

Spalte 1 - Zell-Linien; Spalte 2 - Unterlinien; Spalte 3 - Ausgangsstämme; Spalte 4 - Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Homogenisation; Spalte 5 - Monat des Kulturansatzes; Spalte 6 - Monat der ersten Passage; Spalte 7 - Anzahl der Monate bis zur ersten Passage; Spalte 8 - Anzahl der Passagen bis einschließlich Oktober 81; Spalte 9 - Anzahl der Monate von der ersten Passage bis einschließlich Oktober 81; Spalte 10 - Anzahl der Passagen pro Monat.

Die wichtigsten Daten der 10 etablierten Zell-Linien sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Unterlinien, die sich bei den einzelnen Zell-Linien entwickelten, wurden mit C₁ und N₁ - N₈ bezeichnet (Spalte 2). Unterlinie C₁ besagt, daß die Unterlinie sich durch direkte Passagen aus der Primärkulturflasche entwickelte. Die Unterlinien N₁ bis N₈ entstanden aus den verschiedenen Überständen (1-8), die nach Degeneration der Primärkultur zunächst auf Nunc-Zellkulturröhrchen gegeben wurden und nach Bildung eines Zellrasens passagiert wurden. Bei den Linien z spl₁,

2/10₃ und 2/10₄ entstanden Dauer-Unterlinien aus den Primärkulturflaschen; bei den Linien 2/10₁ und 2/10₂ waren die Primärkulturflaschen bereits vor Konfluenz der Zellen wegen übermäßiger Melanisierung aufgegeben worden. Bei den Zell-Linien Sa₁, Sa₂, Hi₁, Hi₂ und Hi₃ wurden die Primärkulturflaschen nach Konfluenz der Zellen zwar passagiert, diese Passagen führten aber nicht zu stabilen Unterlinien, da die Zellen nach 4-10 Passagen die Proliferation einstellten und melanisierten.

Die Zell-Linien wuchsen unterschiedlich rasch, so daß sie auch unterschiedlich häufig passagiert wurden. Die Anzahl der Passagen pro Monat (Spalte 10) variierte zwischen 1.35 für die Linie 2/10₄, die am langsamsten wuchs, und 1.9 für die Linie Hi₁, die am schnellsten wuchs und im Schnitt zweimal pro Monat passagiert wurde. Im Mittel wurden die Zell-Linien 1.57 mal pro Monat passagiert, das heißt, jeweils nach drei Wochen.

Die Linien 2/10₁ bis 2/10₄ und Hi₂ zeigten Passagenfrequenzen, die unter dem Mittel lagen; die Linien Sa₁ und Sa₂ entsprachen mit ihrer Passagenfrequenz etwa dem Durchschnitt, während die Linien z spl₁, Hi₁ und Hi₃ schneller wuchsen als der Durchschnitt der Zell-Linien. Besonders auffällig verhielt sich die Linie Hi₁, die in der Phase der Primärkultur im Vergleich mit allen anderen Linien besonders langsam proliferierte - die Zeitspanne zwischen Kulturansatz und 1. Passage betrug 8 Monate -, als etablierte Zell-Linie jedoch am schnellsten wuchs. Für die übrigen Zell-Linien waren Beziehungen zwischen der Passagenfrequenz der etablierten Kulturen und der Proliferation in der Phase der Primärkultur nicht erkennbar (vergl. Spalte 10 mit Spalte 7).

Vergleicht man das Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Homogenisation (Spalte 4) mit der Passagenfrequenz, angegeben in Passagen pro Monat (Spalte 10), so fällt auf, daß Kulturen, die aus Embryonen in frühen bis mittleren Embryonalstadien hergestellt wurden, als etablierte Zell-Linien eine relativ langsame Proliferation zeigten. Dies gilt für die Linien Hi₂, 2/10₁, 2/10₂ und 2/10₃, die aus 6 - 15 h alten Embryonen hergestellt wurden und später eine Passagenzahl pro Monat von 1.4 - 1.5 aufwiesen. Die Linie 2/10₄ wurde aus noch jüngeren, nämlich

5 - 7 h alten Embryonen hergestellt, und sie wurde als etablierte Linie am wenigsten häufig, nämlich nur 1.35 mal pro Monat passagiert.

In den Fällen, in denen Embryonen, die sich in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien befanden, zum Ansatz der Kultur verwendet wurden, zeigten die etablierten Zell-Linien eine über dem Durchschnitt liegende Passagenfrequenz. Dies traf auf die Linien Sa_1 , Sa_2 , $z\ spl_1$, Hi_1 und Hi_3 zu, die aus 10 - 18 h alten Embryonen hergestellt wurden und eine Passagenzahl pro Monat von 1.6 - 1.9 erreichten. Innerhalb dieser Gruppe lag die Linie Hi_1 an der Spitze, sie entstand aus den Embryonen mit der am weitesten fortgeschrittenen Entwicklung, 13 - 18 h alt, und zeigte als etablierte Linie die höchste Passagenfrequenz von 1.9 Passagen pro Monat.

3.1.2.1 Morphologie

Hinsichtlich des äußeren Erscheinungsbildes gab es beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zell-Linien. Bei einigen Zell-Linien unterschieden sich auch die einzelnen Unterlinien in ihrer Morphologie.

Sa_1

Die Zell-Linie Sa_1 bestand in ihren beiden Unterlinien N_2 und N_4 überwiegend aus runden bis länglich spindelförmigen Zellen (Abb. 6). Die morphologischen Unterschiede zwischen den zwei Unterlinien waren gering. Die Unterlinie N_2 bildete einen dichten homogenen Zellrasen, während die Unterlinie N_4 dazu neigte, auf einem dünneren Zellrasen einzelne dichte Kolonien zu formen.

Sa_2

Bei der Zell-Linie Sa_2 ähnelten sich die Zellen beider Unterlinien N_1 und N_4 ebenfalls stark in ihrer Morphologie. Vorherrschend waren runde Zellen von zum Teil unterschiedlicher Größe (von sehr klein bis groß), die häufig Vakuolen und Einschlüsse aufwiesen. Dadurch wirkten die Kulturen verhältnismäßig inhomogen (Abb. 7).

z spl₁

Die Unterlinien C₁, N₅F und N₆ der Zell-Linie z spl₁ zeigten alle dasselbe Erscheinungsbild; die Zellen waren klein und rund, manche auch länglich mit 1 - 3 Fortsätzen (Abb. 8). Die Zellen bildeten einen dichten gleichmäßigen Rasen, nur bei der Unterlinie N₆ formten sich einzelne mehrschichtige Zellkolonien auf dem Rasen.

Hi₁

Die Zellen der beiden Unterlinien N₄ und N₆ der Zell-Linie Hi₁ waren morphologisch sehr ähnlich; die Kulturen bestanden aus kleinen Zellen, die rund bis leicht polygonal schienen (Abb. 9). Der Zellrasen war dicht und homogen.

Hi₂

Die beiden Unterlinien N₄ und N₈ der Zell-Linie Hi₂ bestanden aus Zellpopulationen unterschiedlicher Zellgröße. Es waren überwiegend runde bis leicht längliche Zellen zu finden, die in der Größe (von sehr klein bis sehr groß) variierten, wobei besonders die großen Zellen Vakuolen und Einschlüsse aufwiesen (Abb. 10). Die Zellen hafteten relativ schlecht auf der Unterlage und bildeten nur einen dünnen ungleichmäßigen Rasen aus.

Hi₃

Bei den vier Unterlinien N₄, N₆, N₇ und N₈ der Zell-Linie Hi₃ überwog der länglich epitheliale Zelltyp. Die Zellen waren von einheitlicher mittlerer Größe mit deutlich sichtbaren Nucleoli und ein bis mehreren Vakuolen (Abb. 11). Es bestand eine starke Tendenz zur Bildung von großen Haufenkolonien auf relativ dünnem Zellrasen.

2/10₁

Die drei Unterlinien N₁, N₂ und N₃ der Zell-Linie 2/10₁ wuchsen in zwei morphologisch deutlich unterscheidbaren Zelltypen. Die Unterlinie N₁ bestand aus kleinen runden bis leicht polygonalen Zellen, die einen gleichmäßigen Zellrasen formten (Abb. 12). Die Unterlinien N₂ und N₃ hingegen bestanden aus Fibroblasten-ähnlichen Zellen mit sehr langen Fortsätzen, mit deren Hilfe sie ausgedehnte Netze bildeten (Abb. 13).

2/10₂

Bei der Zell-Linie 2/10₂ herrschte ein kleiner runder Zelltyp vor (Abb. 14). Die Zellen hafteten eher schlecht auf der Unterlage und gingen sehr leicht in Suspension. Sie vermochten daher keinen dichten Rasen zu bilden.

2/10₃

Die Zellen der Unterlinie C₁, N₂ und N₄ der Zell-Linie 2/10₃ glichen sich in ihrem Erscheinungsbild. Sie waren klein und rund, einzelne leicht spindelförmig mit Fortsätzen (Abb. 15). Der Zellrasen war im allgemeinen dicht und gleichmäßig, nur bei der Unterlinie N₄ waren Haufenkolonien auf einem dichten Zellrasen zu beobachten.

2/10₄

Auch bei den beiden Unterlinien C₁ und N₂ der Zell-Linie 2/10₄ waren keine großen Unterschiede hinsichtlich der Zell-Morphologie zu beobachten. Polygonale Zellen mit einem deutlich erkennbaren Nucleolus, Epithelzellen ähnelnd, herrschten vor, dazwischen wuchsen Fibroblasten-ähnliche Zellen (Abb. 16). Letztere bildeten vereinzelt netzförmige mehrschichtige Kolonien.

Primärkulturen (Abb. 2 - 5)

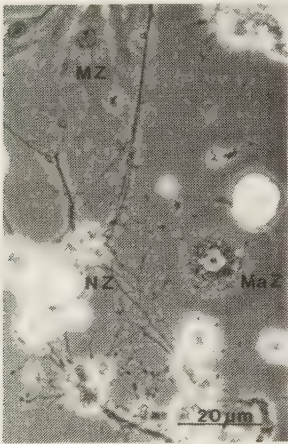


Abb.2. Primärkultur (5d). Nervenzellen mit Fortsätzen (NZ), Muskelzellen (MZ), Makrophagen-ähnliche Zelle (MaZ).



Abb.3. Primärkultur (8d). Muskelzellgeflecht

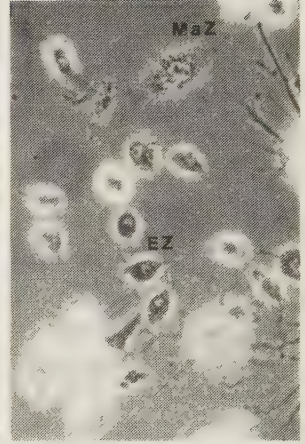


Abb.4. Primärkultur (10d). Makrophagen-ähnliche Zelle (MaZ), Epithelzellen (EZ).

Morphologie der Zell-Linien (Abb. 6 - 16)

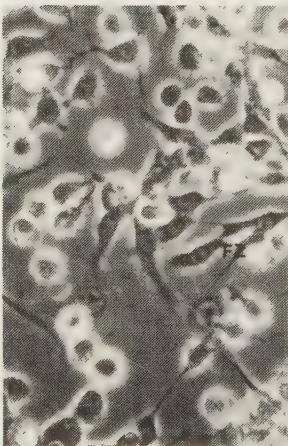


Abb.5. Primärkultur (20d). Fibroblasten-ähnliche Zellen (FZ).

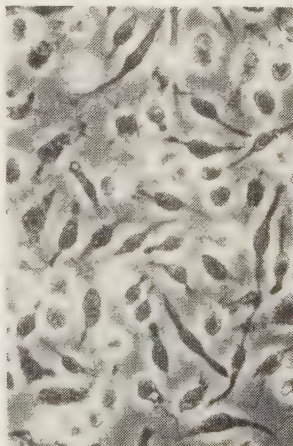


Abb.6. Zell-Linie Sa₁, Unterlinie N₂.

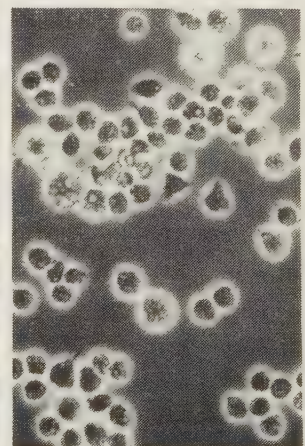


Abb.7. Zell-Linie Sa₂, Unterlinie N₁.

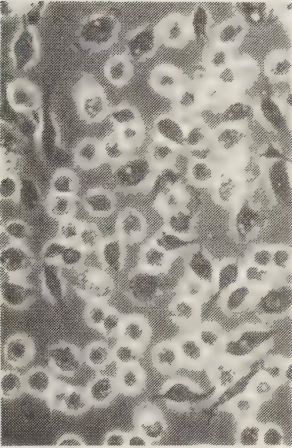


Abb.8. Zell-Linie z spl₁,
Unterlinie C₁.

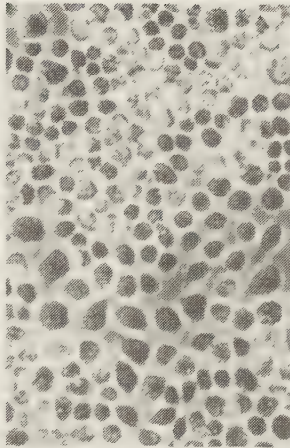


Abb.9. Zell-Linie Hi₁,
Unterlinie N₄.

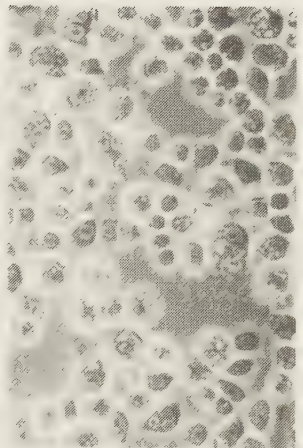


Abb.10. Zell-Linie Hi₂,
Unterlinie N₄.

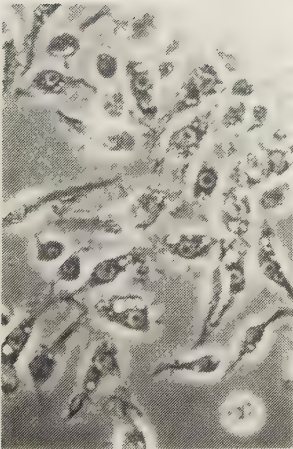


Abb.11. Zell-Linie Hi₃,
Unterlinie N₇,

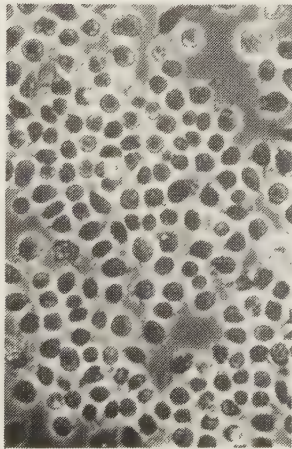


Abb.12. Zell-Linie 2/10₁,
Unterlinie N₁.

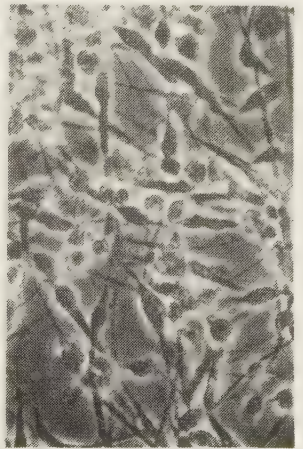


Abb.13. Zell-Linie 2/10₁,
Unterlinie N₂.

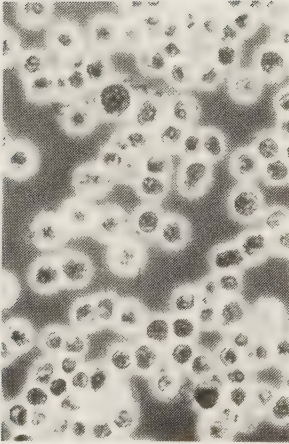


Abb.14. Zell-Linie $2/10_2$,
Unterlinie N_2 .

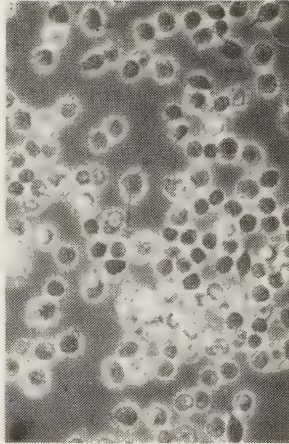


Abb.15. Zell-Linie $2/10_3$,
Unterlinie C_1 .

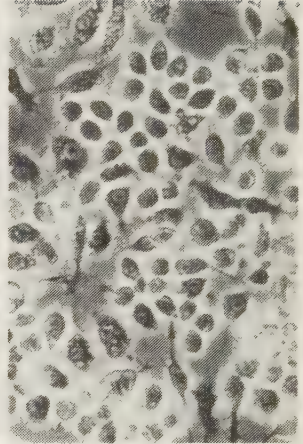


Abb.16. Zell-Linie $2/10_4$,
Unterlinie C_1 .

Karyotypen (Abb. 17 - 25)

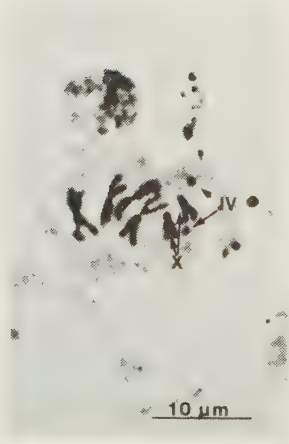


Abb.17. Weiblicher Chromosomensatz, XX (Zell-Linie Sa_2).

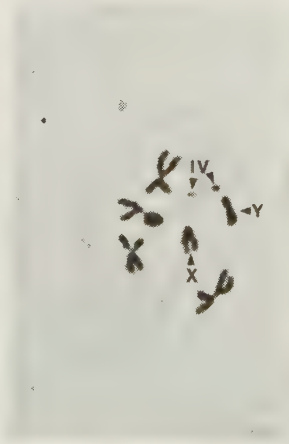


Abb.18. Männlicher Chromosomensatz, XY (Zell-Linie $2/10_2$).

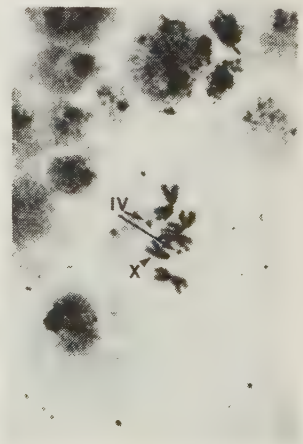


Abb.19. XO Chromosomensatz (Zell-Linie $2/10_1$).



Abb.20. XO, haplo IV Chromosomensatz der Zell-Linie Sa₂.

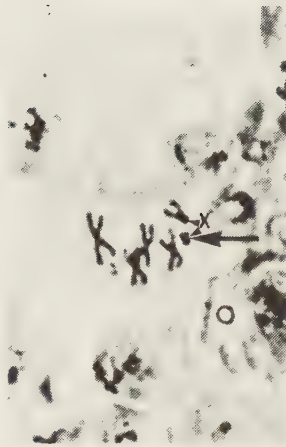


Abb.21. XX Chromosomensatz der Zell-Linie Hi₁; ein X Chromosom ist stark reduziert (großer Pfeil).

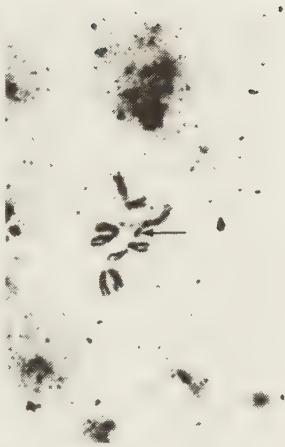


Abb.22. XO Chromosomensatz der Zell-Linie Hi₃, Unterlinie N₇; das X Chromosom besitzt zusätzliches Heterochromatin (Pfeil).



Abb.23. XX Chromosomensatz der Zell-Linie 2/10₃; ein X Chromosom ist verkürzt (großer Pfeil).



Abb.24. Chromosomensatz von Zellen der Zell-Linie z spl₁, Unterlinie C₁; neben dem compound-XX Chromosom (großer Pfeil) sind zwei stark anfärbare Chromatinfragmente vorhanden (kleine Pfeile), die die Größe der freien Duplikation haben, keine IV. Chromosomen erkennbar.

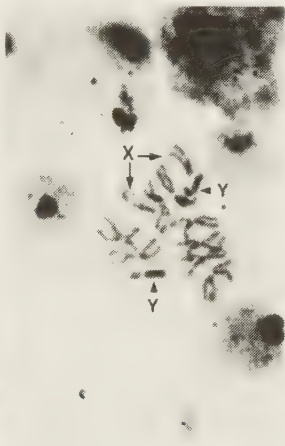


Abb.25. Tetraploider XY Chromosomensatz der Zell-Linie Sa₁, Unterlinie N₂.

3.1.2.2 Chromosomenverhältnisse

Die Chromosomenanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung der Zell-Linien zeigten, daß im Verlauf der Evolution der Zell-Linien große Veränderungen in den Chromosomenverhältnissen auftraten (Tabelle 2). Das ursprüngliche Zell-Homogenat aus Embryonen bestand ja zu etwa gleichen Teilen aus weiblichen XX und männlichen XY Zellen, die wohl auch überwiegend den diploiden Chromosomensatz aufwiesen (das Geschlecht eines Embryo ist außer durch Chromosomenanalyse nicht feststellbar). Aus diesem anfänglichen Gemisch von weiblichen und männlichen Zellen entwickelten sich Zell-Linien mit überwiegend oder ausschließlich weiblichen XX Zellen (Abb. 17), zum Beispiel die Linien Hi_2 und Hi_3 (Unterlinie N_8) und die Linie $z spl_1$ (compound- $\overline{XX}$). Andererseits entstanden auch Zell-Linien, bei denen die männlichen XY Zellen (Abb. 18) überwogen (Zell-Linie Sa_1 , Unterlinie N_2 und Zell-Linie $2/10_2$). Die meisten Zell-Linien behielten weibliche und männliche Zellen in unterschiedlichen und zum Teil wechselnden Proportionen bei.

Der Anteil von XO Zellen, (Abb. 19), entstanden durch Verlust entweder eines X Chromosoms ($XX \rightarrow XO$) oder des Y Chromosoms ($XY \rightarrow XO$), nahm im Verlauf der Evolution der Linien meist zu. Dies galt für die Linie Sa_2 , bei der zudem ca. 60 % der XO Zellen nur ein IV. Chromosom besaßen (Abb. 20). Einen rapide steigenden Anteil von XO Zellen zeigte auch die Linie Hi_1 ; parallel dazu verringerte sich der Anteil der XX Zellen. Letztere hatten ein X Chromosom, das fast ausschließlich aus Heterochromatin bestand und nur mehr einen winzigen Rest von Euchromatin zu besitzen schien (Abb. 21). Dieses fragmentierte X Chromosom ging wohl sehr häufig verloren, wie die starke Zunahme an XO Zellen vermuten läßt. Die Zell-Linie Hi_3 , Unterlinie N_7 , entwickelte sich zur reinen XO Linie. Das X Chromosom dieser XO Zellen war größer als normal, es zeigte ein zusätzliches Stück Heterochromatin (Abb. 22). Ein in der Größe verändertes X Chromosom wurde auch bei der Zell-Linie $2/10_3$ beobachtet. Zwei Drittel der XX Zellen in der 10. Passage und 100 % der XX Zellen in der 23. Passage hatten ein verkürztes X Chromosom, das nur den Heterochromatinbereich und einen kleinen Teil des Euchromatins besaß (Abb. 23).

Tabelle 2: Karyotypen der Zell-Linien

Zell-Linie	Unterlinie	Monat	Passage	XX	XY	XO	diploid	tetrapl.	aneupl.	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Sa ₁	N ₂	Juli 79	3	10	90	-	97	3	1	
	N ₂	Okt. 80	21	-	97	3	71	26	3	
	N ₂	Juli 81	39	-	98	2	42	56	2	
	N ₄	Nov. 79	7	40	50	10	92	8	-	
	N ₄	Jan. 80	10	45	30	25	80	20	-	
	N ₄	Okt. 80	21	52	38	10	91	7	2	
	N ₄	Juli 81	34	20	71	9	89	6	5	
Sa ₂	N ₁	Juli 79	2	66	20	14	85	15	-	
	N ₁	Nov. 79	7	25	12	63 ¹⁾	92	7	1	1) XO z.Teil haplo IV
	N ₁	Jan. 80	10	18	6	76 ¹⁾	87	12	1	
	N ₁	Okt. 80	20	10	5	85 ¹⁾	87	12	1	
	N ₁	Juli 81	39	8	2	90 ¹⁾	72	20	8	
Hi ₁	N ₄	Jan. 80	3	100 ²⁾	-	-	96	3	1	2) 1x Chromosom nur Fragment
	N ₄	Okt. 80	17	74 ²⁾	-	26	54	42	4	
	N ₄	Juli 81	32	16 ²⁾	-	84	60	36	4	
Hi ₂	N ₈	Jan. 80	2	80	-	20	80	13	7	
	N ₈	Okt. 80	10	84	-	16	88	11	1	
	N ₈	Juli 81	23	89	-	11	88	11	1	
Hi ₃	U	Jan. 80	0	92	4	4	80	20	-	
	N ₇	Okt. 80	10	12	-	88 ³⁾	71	26	3	3) X Chromosom mit zusätzl. Heterochromatin
	N ₇	Juli 81	26	-	-	100 ³⁾	85	15	-	
	N ₈	Juli 81	27	93	-	7	84	15	1	
2/10 ₁	N ₂	Nov. 79	1	50	30	20	91	4	5	
	N ₂	Jan. 80	3	43	35	22	98	1	1	
	N ₂	Okt. 80	13	57	26	17	97	-	3	
	N ₂	Juli 81	26	42	34	24	98	-	2	
2/10 ₂	N ₂	Jan. 80	2	-	100	-	82	13	5	
	N ₂	Okt. 80	12	-	100	-	80	13	7	
	N ₂	Juli 81	25	-	100	-	85	10	5	
2/10 ₃	C ₁	Okt. 80	10	26 ⁴⁾ 50 ⁴⁾	9	15	70	22	8	4) 2.X Chromosom mit Deletion
	C ₁	Juli 81	23	77 ⁴⁾	-	23	94	4	2	
2/10 ₄	N ₂	Okt. 80	9	80	15	5	95	5	-	
	N ₂	Juli 81	19	82	9	9	90	8	2	
z spl ₁	C ₁	Juli 79	0	XX+D 85	XY+D 15	-	97	3	-	
	C ₁	Nov. 79	5	83	17	-	95	5	-	
	C ₁	Jan. 80	8	87	13	-	94	6	-	
	C ₁	Okt. 80	20	93 ⁵⁾	7	-	88	12	-	5) +Chromosomen- fragment
	C ₁	Juli 81	36	90 ⁵⁾	10	-	97	3	-	
	N ₅ F	Okt. 80	21	100	-	-	83	14	3	
	N ₅ F	Juli 81	36	100	-	-	80	15	5	

Spalte 1 und 2 - zur Untersuchung verwendete Linien und Unterlinien; Spalte 3 - Zeitpunkt der Chromosomenpräparation; Spalte 4 - erreichte Passagenzahl; Spalten 5-10 - Prozentsätze an Metaphase-Zellen mit XX, XY, XO, sowie diploiden, tetraploiden und aneuploiden Chromosomensätzen.

Die Zell-Linie $z\ spl_1$ entstand aus dem Drosophila-Stamm $z\ spl\ cv$, der eine freie Duplikation ($Dp(1;f)z^9$) für das distale Ende des X Chromosoms trägt; die Weibchen besitzen compound-X Chromosomen, die Männchen tragen compound- $\overline{XY}$ Chromosomen, wobei dem X Chromosom das distale Ende fehlt (Defizienz $Df(1)sc^{J4R}$). Diese Defizienz ist durch die freie Duplikation $Dp(1;f)z^9$ kompensiert. Metaphase-Zellen aus beiden untersuchten Unterlinien dieser Zell-Linie enthielten stets die freie Duplikation. Ab der 20. Passage zeigte etwa ein Drittel der weiblichen Zellen der Unterlinie C_1 ein zusätzliches, stark anfärbbares Chromatinfragment (Abb. 24). Die IV. Chromosomen waren in diesen Fällen als separate Einheiten nicht zu erkennen. Die Verbindung der Geschlechtschromosomen wurde im Verlauf der Evolution der Zell-Linie nicht gelöst. Die Chromosomenverhältnisse des Ausgangsmaterials, compound- $\overline{XX}$ + Duplikation und compound- $\overline{XY}$ + Duplikation, erwiesen sich demnach als stabil.

Bezüglich der Anzahl der Chromosomensätze waren die Zell-Linien teilweise Veränderungen unterworfen. Die meisten Zell-Linien behielten einen relativ hohen Diploidiegrad - als diploid wird eine Zell-Linie im allgemeinen bezeichnet, wenn mehr als 80 % der Zellen den diploiden Chromosomensatz aufweisen. Einige Zell-Linien, vornehmlich die Linien Sa_1 , Unterlinie N_2 , und Hi_1 , beide schnell wachsend, zeigten eine starke Abnahme im Anteil der diploiden Zellpopulation und entsprechend eine starke Zunahme im Anteil der tetraploiden Zellen (Abb. 25). Der Prozentsatz aneuploider Zellen an der Gesamt-Zellpopulation hielt sich in allen Fällen unter 10 %.

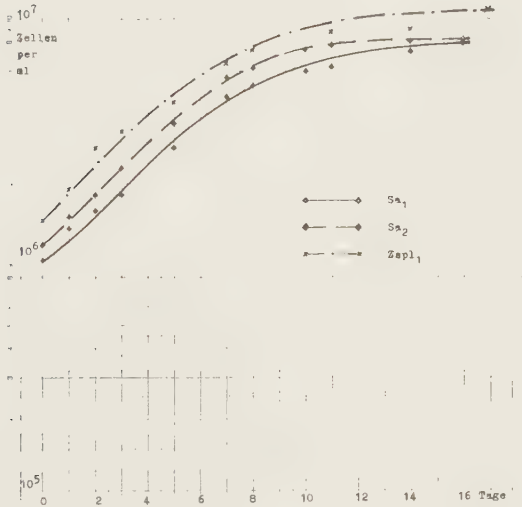
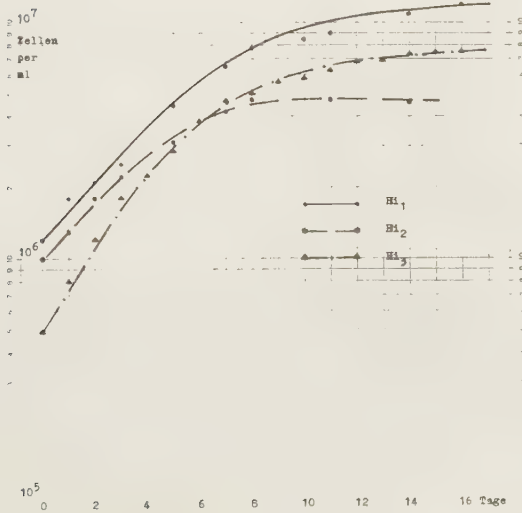
3.1.2.3 WachstumAbbildung 26: Wachstumskurven Sa_1 , Sa_2 , z spl_1 Abbildung 27: Wachstumskurven Hi_1 , Hi_2 , Hi_3 

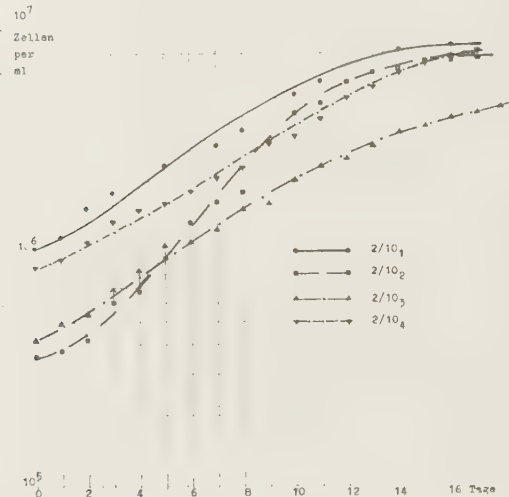
Abbildung 28: Wachstumskurven $2/10_1$, $2/10_2$, $2/10_3$, $2/10_4$ 

Tabelle 3: Wachstumskurven

Zell-Linie	Passage	Anfangs-titer Zellen/ml	End-titer Zellen/ml	Wachstumsper. Tage	Verdop-pel. Zeit Tage	Anzahl Verdoppel.
1	2	3	4	5	6	7
$Sa_1(N_4)$	12	$9.5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^6$	16	3	3
$Sa_2(N_1)$	12	$1.1 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	16	2.9	3
$z spl_1(C_1)$	10	$1.4 \cdot 10^6$	$1.1 \cdot 10^7$	17	2.9	3
$Hi_1(N_4)$	5	$1.2 \cdot 10^6$	$1.2 \cdot 10^7$	16	2.6	3
$Hi_2(N_8)$	5	$1 \cdot 10^6$	$4.5 \cdot 10^6$	14	3.25	2
$Hi_3(N_7)$	25	$4.9 \cdot 10^5$	$7.6 \cdot 10^6$	16	1.8	4
$2/10_1(N_2)$	5	$1 \cdot 10^6$	$7.5 \cdot 10^6$	16	4.25	3
$2/10_2(N_2)$	26	$3.6 \cdot 10^5$	$6.5 \cdot 10^6$	17	3.25	4
$2/10_3(N_2)$	24	$4.2 \cdot 10^5$	$6.2 \cdot 10^6$	21	4.3	4
$2/10_4(C_1)$	20	$8.5 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^6$	17	5	3
Mittel		$8.8 \cdot 10^5$	$7.8 \cdot 10^6$	16.6	3.3	

Spalte 1 - Zell-Linie, Unterlinie; Spalte 2 - Passagennummer; Spalte 3 - eingesetzter Zelltitel; Spalte 4 - erreichter Zelltitel; Spalte 5 - Anzahl der Tage, über die das Zellwachstum verfolgt wurde; Spalte 6 - Verdoppelungszeit in Tagen; Spalte 7 - erfolgte Verdoppelungsschritte bis zum Erreichen des Endtiters.

Die wichtigsten Daten, die aus den vorliegenden Wachstumskurven (Abb. 26-28) zu entnehmen sind, sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Der Mindest-Zelltiter der erforderlich war, um ein kontinuierliches Zellwachstum ohne ausgedehnte lag-Phase zu gewährleisten, lag bei $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml, der Anfangs-Zelltiter betrug im Mittel $8.8 \cdot 10^5$ Zellen/ml (Tabelle 3, Spalte 3). Die Zelldichte im Plateaubereich einer Wachstumskurve erreichte im allgemeinen Werte zwischen $6 - 10 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Bei den Zell-Linien $z\ spl_1$ und Hi_1 wurde dieser Endtiter geringfügig überschritten ($1.1 - 1.2 \cdot 10^7$ Zellen/ml), die Zell-Linie Hi_2 erreichte nur einen deutlich darunter liegenden Endtiter von $4.5 \cdot 10^6$ Zellen/ml (Tabelle 3, Spalte 4). Die in Tabelle 3, Spalte 6 angegebene Verdoppelungszeit der einzelnen Zell-Linien wurde aus den Wachstumskurven errechnet. Als Verdoppelungszeit in Tagen wurde das Mittel genommen aus der Anzahl von Tagen, die für die ersten zwei Verdoppelungsschritte einer Zellkultur benötigt wurden; damit wurde fast nur die logarithmische Phase des Wachstums einer Kultur berücksichtigt. Der Übergang in den Plateaubereich, in dem sich das Wachstum und die Teilungsaktivität der Zellen bedeutend verlangsamte, wurde nicht in die Berechnung mit einbezogen. Die Verdoppelungszeit der meisten Zell-Linien lag bei ca. 3 Tagen. Diese Verdoppelungszeit in Tagen kann als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellkultur genommen werden. Eine extrem kurze Verdoppelungszeit von 1.8 Tagen zeigte die Zell-Linie Hi_3 , extrem lange Verdoppelungszeiten hatten dagegen die Linien $2/10_1$, $2/10_3$ und $2/10_4$. Diese langsam wachsenden Zell-Linien benötigten zwischen 4 und 5 Tagen, um ihre Zellzahl einmal zu verdoppeln.

Bei einem Vergleich dieser Verdoppelungszeiten mit der Anzahl der Passagen pro Monat, aufgetragen in Tabelle 1, Spalte 10, ergaben sich für die meisten Zell-Linien Übereinstimmungen. Die Zell-Linien, die 3 oder weniger Tage benötigten, um ihre Zellzahl einmal zu verdoppeln (die Linien Sa_1 , Sa_2 , $z\ spl_1$, Hi_1 und Hi_3), wurden häufiger pro Monat passagiert (1.6 - 1.9 mal pro Monat) als die Zell-Linien, die für einen Verdoppelungsschritt mehr als 3 Tage benötigten (die Linien Hi_2 , $2/10_1$, $2/10_2$, $2/10_3$ und $2/10_4$). Diese wurden durchschnittlich 1.35 - 1.5 mal pro Monat passagiert. Die besonders langsam wachsende Zell-Linie $2/10_4$ (Verdoppelungszeit 5 Tage) mußte nur 1.35 mal pro Monat

passagiert werden (Tabelle 1, Spalte 10).

Nach Tabelle 1, Spalte 10 erwies sich die Zell-Linie Hi_1 als die Linie mit der stärksten Proliferation, sie mußte - mit 1.9 mal pro Monat - am häufigsten passagiert werden; aus den Daten der Wachstumskurve ergab sich eine - niedrige - Verdoppelungszeit von 2.6 Tagen (Tabelle 3, Spalte 6). Die absolut kürzeste Verdoppelungszeit von nur 1.8 Tagen zeigte aber die Zell-Linie Hi_3 , die weniger häufig passagiert wurde (1.75 mal pro Monat). Als eine mögliche Erklärung für diese beobachtete Diskrepanz mag die Tatsache dienen, daß die Wachstumskurven der einzelnen Zell-Linien zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Entwicklung der stabilen Linien erstellt wurden. Die Wachstumskurven entsprechen dem momentanen Verhalten der Kultur zum Zeitpunkt der jeweiligen Passage, wohingegen die in Passagen pro Monat ausgedrückte Proliferation der Zell-Linien einen Durchschnittswert für das Zellwachstum über einen Zeitraum von 20 - 30 Monaten gibt. Die Wachstumskurve der Zell-Linie Hi_1 wurde relativ früh, in der 5. Passage, erstellt; zu diesem Zeitpunkt hatte die Zell-Linie noch kein extrem schnelles Wachstum gezeigt. Die Wachstumskurve der Zell-Linie Hi_3 wurde demgegenüber zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt (25. Passage) in der Entwicklung der Linie erstellt; ein Zeitpunkt, zu dem die Linie tatsächlich eine hohe Proliferationsrate gezeigt hatte: ab ca. der 20. Passage mußten die Zellen dieser Linie jeweils nach 2 Wochen passagiert werden, da sie, selbst bei niedrigem Anfangszelltiter (siehe Tabelle 3, Spalte 3) innerhalb von 10 - 14 Tagen einen dichten Zellrasen bildeten.

Die Anzahl der Verdoppelungsschritte, die eine Kultur vom Ansatz bis zur Erreichung des Endtiters durchlief, wurde in Tabelle 3, Spalte 7 aufgetragen. Im allgemeinen verdoppelten sich die Zellkulturen ca. 3 mal bis sie im Plateau den Endtiter erreichten. Als Extremfälle erwiesen sich die Zell-Linien Hi_2 , die sich nur etwas mehr als 2 mal verdoppelte, und die Zell-Linien Hi_3 , $2/10_2$ und $2/10_3$, die sich jeweils ca. 4 mal verdoppelten, bevor sie den Endtiter erreichten. Der Anfangstiter dieser drei Zell-Linien lag allerdings sehr niedrig, so daß die Kulturen notwendigerweise einen zusätzlichen Verdoppelungs-

schritt durchlaufen mußten, um den durchschnittlichen Anfangszelltiter von ca. $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml zu erreichen. Das Zellwachstum wurde im allgemeinen über einen Zeitraum von 16 - 17 Tagen verfolgt (Tabelle 3, Spalte 5); nach 12 - 14 Tagen Inkubation mündete die Wachstumskurve der meisten Zell-Linien ins Plateau. Bei der Zell-Linie 2/10₃ zeigte die Wachstumskurve nach 16 Tagen Inkubation noch steigende Tendenz, weswegen das Wachstum dieser einen Linie über 21 Tage hin verfolgt wurde. Eine weitere, etwas vom Mittel abweichende Zell-Linie, die Linie Hi₂, zeigte das Plateau in der Wachstumskurve bereits nach ca. 8 Tagen. Die Zellen hatten sich bis zu diesem Zeitpunkt bei einem etwa dem Mittel entsprechenden Anfangstiter von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml nur wenig mehr als 2 mal verdoppelt und stellten bei einem Titer von $4.5 \cdot 10^6$ Zellen/ml das weitere Wachstum ein.

3.2 Zell- und Kerntransplantationen am Ei

Frühe Embryonalentwicklung von *Drosophila*

Die Entwicklung des Embryo beginnt bei *Drosophila* wie bei den meisten Insekten nach der Befruchtung mit einer superfiziellen Furchung, in deren Verlauf neun synchrone Kernteilungen im Inneren des Eies ablaufen. Die Furchungskerne umgeben sich mit Plasmahöfen und verteilen sich zunächst gleichmäßig im Dotterbereich des Eies. Anschließend wandern sie in den Periplasma-saum an der Eioberfläche ein, wo vier weitere Kernteilungen ablaufen (Zalokar und Erk, 1976). Dieses Stadium wird allgemein als das Präblastoderm bezeichnet. Einige Furchungskerne bleiben im Dotter zurück und bilden mit ihren Cytoplasmahöfen die sogenannten Vitellophagen.

Erst nach der letzten (13.) Kernteilung, ca. 3 h 20' nach Eiablage, werden Zellmembranen gebildet, die von der Peripherie nach innen einwachsen und sich basal verbinden, so daß im Stadium des Blastoderms ein einschichtiges kolumnäres Zellepithel das Ei umgibt. Die Polzellen am Hinterpol werden als separate Einheiten bereits früher, etwa 2 h nach Eiablage, vom Dotterbereich abgesondert. Im Stadium des zellulären Blastoderms sind, mit Ausnahme der Polzellen, cytologisch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Blastodermzellen zu beobachten.

Eine lichtmikroskopisch klar erkennbare Differenzierung von Zellen beginnt - im Stadium der Gastrulation - mit der Invagination des Keimstreifs in der ventralen Mittellinie und der Invagination der hinteren Mitteldarmanlage am Hinterpol, sowie der Invagination der vorderen Mitteldarmanlage. Mit der Verlängerung des Keimstreifs um den Hinterpol herum wird die hintere Mitteldarmanlage mit den Polzellen dorsal nach vorne verlagert bis der Keimstreif seine maximale Ausdehnung, etwa 5 h nach Eiablage, erreicht hat. Die weiteren Entwicklungsschritte wie die Anlage der larvalen Segmente, Keimstreifverkürzung, Rückenschluß und Involution des Kopfes laufen dann in rascher Folge ab, so daß schon 11-12 h nach Eiablage die embryonale Morphogenese abgeschlossen ist. In den folgenden 10 h wird die larvale Organogenese vollendet und der Embryo ist, ca. 22 h nach Eiablage, schlüpfbereit. (Alle Zeitangaben sind bezogen auf eine Temperatur von + 25°C).

3.2.1 Ergebnisse der einzelnen Transplantationsserien

3.2.1.1 Transplantation von Präblastodermkernen

In den drei ersten Versuchsserien wurden Kerne, die Eiern im Stadium des Präblastoderms entnommen wurden, in Eier transplantiert, die sich in den Entwicklungsstadien der Furchung, des Präblastoderms und des zellulären Blastoderms befanden. 3 - 6 Kerne aus der vorderen Polregion von (nicht-zellulären) Präblastodermstadien aus mwh e Embryonen wurden in den Hinterpol von Furchungsstadien befruchteter y w f^{36a} mal Embryonen transplantiert, die zwischen 45 und 75 Minuten alt waren. Zur Kontrolle bezüglich der Defekt- und Überlebensraten wurden Furchungsstadien befruchteter y w f^{36a} mal Embryonen am Hinterpol angestochen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Entwicklungspotenz von Präblastodermkernen nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Stadium der Furchung

	Transpl.	1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	Mosaik ges. larval adult		
AK-P-F	157	121	12	81	74	64	62	8	19	6	13
	% 100	77.0	7.7	51.6	47.1	40.7	39.5	5.1	12.1	3.8	8.3
Kontrolle	83	66	4	50	48	48	48	3	-	-	-
(Anstich betr.Fur- chungsst.)	% 100	79.5	4.8	60.2	57.8	57.8	57.8	3.6			

AK = Kerne aus anteriorem Pol, F = Furchung, P = posteriorer Pol

Wie aus der Tabelle ersichtlich, war der Prozentsatz an geschlüpften 1. Larven bei der Kontroll-Anstichserie geringfügig höher als bei der Transplantationsserie, der Anteil defekter 1. Larven war bei der Kontrollserie deutlich geringer. Auch ein Vergleich der weiteren Entwicklungsstadien ergab für die Kontrolltiere eine höhere Überlebensrate als für die Transplantationstiere, die Differenz der jeweiligen Überlebensraten erreichte im adulten Stadium den höchsten Wert: Am Hinterpol angestochene befruchtete y w f^{36a} mal Eier entwickelten sich zu 57.8 % zu adulten Fliegen, während befruchtete y w f^{36a} mal Eier, denen Präblastodermkerne am Hinterpol injiziert worden waren, nur in 39.5 % der Fälle zu adulten Tieren führten. Die Defektrate dieser Tiere war mit 5.1 % etwas höher als die der Kontroll-Anstichtiere mit 3.6 %.

Die Wahrscheinlichkeit für ein manipuliertes Ei, eine normale Embryonal-, Larval- und Adultentwicklung zu durchlaufen, verringerte sich demnach, wenn das Ei nicht nur angestochen wurde, sondern wenn ihm Fremdmaterial - hier Präblastodermkerne - injiziert wurde. Dieses Fremdmaterial mag Entwicklungsabläufe während der Embryonalentwicklung beeinträchtigt haben, z.B. indem es Zellen und Zellgruppen, die zur Differenzierung auf räumliche Nähe angewiesen waren, trennte. Aus demselben Grunde wäre für die Transplantationstiere nicht nur eine geringere Überlebensrate, sondern gleichzeitig eine höhere Defektrate zu erwarten, die ja beobachtet wurde.

Bei der zweiten Transplantationsserie wurden 6 - 10 Kerne aus dem vorderen Lateralbereich (0.66 Eilänge, posteriorer Pol = 0, anteriorer Pol = 1) von mwh e Präblastodermstadien entnommen und in den Hinterpol befruchteter y w f^{36a} mal Embryonen, etwa 150 - 180 Minuten nach Eiablage, transplantiert, die sich ebenfalls im Präblastodermstadium befanden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Entwicklungspotenz von Präblastodermkernen aus der Lateralregion nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Stadium des Präblastoderms

	Transpl. 1.Larve defekt 2.Larve 3.Larve Puppe Adulte defekt								Mosaik		
									ges.	larval	adult
LK+P-PB	115	94	20	76	70	69	67	12	-	-	-
%	100	81.7	17.4	66.1	60.9	60.0	58.3	10.4			

PB = Präblastoderm, LK = Kerne aus Lateralregion, P = posteriorer Pol

Sowohl Überlebens- und Defektraten als auch die Mosaikraten dieser zweiten Serie wichen von denen der ersten Serie stark ab. In beiden Serien wurden Kerne aus Präblastodermstadien von mwh e Embryonen transplantiert. Die Herkunft der mwh e Spenderkerne war allerdings nicht identisch, in der ersten Serie wurden Kerne aus dem Vorderpolbereich entnommen und in der zweiten Serie aus dem vorderen Lateralbereich.

Die Überlebensraten der Eier, denen im Präblastodermstadium Kerne injiziert wurden, glichen denen der im Furchungsstadium nur angestochenen Eier und lagen damit signifikant höher als

die Überlebensraten der Eier, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation im Furchungsstadium befanden. Eier im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium des Präblastoderms reagieren demnach weniger empfindlich auf Injektionen von Fremdmaterial als Eier im frühen Entwicklungsstadium der Furchung. Dies war zu beobachten, obgleich in das Präblastoderm eine etwa doppelt so große Menge an Fremdmaterial injiziert wurde wie in Eier des Furchungsstadiums.

Die Defektraten für Larven (17.4 %) und Adulte (10.4 %) waren allerdings in Transplantationsserie 2 mehr als doppelt so hoch wie in Transplantationsserie 1 (Tab. 4 und 5). Die Injektion von Fremdmaterial beeinträchtigte die Entwicklung von Präblastodermstadien anscheinend dergestalt, daß sie, verglichen mit der Anstichserie im Furchungsstadium, wohl keine erhöhte Letalität, jedoch eine erhöhte Defektrate bewirkte. Durch das Fremdmaterial ausgelöste Störungen im Entwicklungsablauf waren demnach häufig schwer genug, zu Defekten zu führen, jedoch nicht gravierend genug, ein Absterben des Organismus zu bewirken.

Am deutlichsten unterschieden sich die Ergebnisse der ersten und zweiten Transplantationsserie im Hinblick auf das Auftreten von Mosaiktieren. Etwa ein Achtel der Eier, denen im Furchungsstadium markierte Präblastodermkerne in den Hinterpol injiziert worden waren, entwickelte sich zu Tieren, die Mosaikgewebe aufwiesen, d.h. in diesen 12.1 % der Fälle konnte fremdes Genmaterial als im Empfängergewebe integriert nachgewiesen werden. Von den Eiern, denen im Präblastodermstadium Präblastodermkerne in den Hinterpol injiziert worden waren, zeigte kein einziges als Larve oder Fliege Mosaikgewebe. Die Herkunftsregion der jeweiligen Blastodermkerne war zwar nicht exakt gleich, doch nach Illmensee (1972) wurden Kerne aus anderen Regionen des Präblastoderms, z.B. Ventralbereich Mitte, gleichermaßen in Gewebe von Empfänger-Eiern, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation in der Furchung befanden, integriert. Eier im Präblastodermstadium haben offensichtlich die Befähigung, fremde Kerne aus einem gleich alten Spenderstadium in das eigene Gewebe zu integrieren, ganz oder teilweise verloren.

In einer weiteren Transplantationsserie wurden 5 - 8 Kerne aus Präblastodermstadien von mwh e Embryonen in y w f^{36a} mal Empfängereier transplantiert; die bereits ein zelluläres Blastoderm gebildet hatten und etwa 210 Minuten nach Eiablage alt waren. Das Entwicklungsstadium des zellulären Blastoderms läßt sich unter dem Mikroskop (Vergrößerung 500 x) gut erkennen und vom Präblastoderm unterscheiden durch das Vorhandensein sowohl der Zellmembranen zwischen den Blastodermzellen als auch der Basalmembranen, die die periphere Blastodermzellschicht gegen den innen liegenden Dotter abgrenzen.

Die Transplantationsserie sollte als Kontrolle dienen für die im nächsten Kapitel beschriebenen Transplantationen von Blastodermzellen in zelluläre Blastodermstadien, insbesondere für den Typ der homotopen Transplantationen, bei denen Zellen aus einer bestimmten Spenderregion in die gleiche Region des Empfängerblastoderms injiziert wurden. Entsprechend wurden in dieser dritten Serie die folgenden Transplantationen durchgeführt: a) mwh e Präblastodermkerne aus dem hinteren Polbereich wurden in den Hinterpol zellulärer Blastodermstadien von y w f^{36a} mal Embryonen injiziert und b) mwh e Präblastodermkerne aus dem vorderen Polbereich wurden in den Vorderpol zellulärer Blastodermstadien von y w f^{36a} mal Empfängern injiziert. Um sicherzustellen, daß beim Absaugen der Blastodermkerne aus dem Hinterpolbereich keine der zu diesem Zeitpunkt bereits abgegrenzten Polzellen mit in die Kanüle aufgenommen wurden, wurden die Kerne in diesem Fall aus der Lateralregion ein wenig anterior zum Hinterpol, (etwa 0.1 Eilänge, Hinterpol = 0.0 Eilänge) entnommen.

Tabelle 6: Entwicklungspotenz von Präblastodermkernen nach Transplantation in den Hinterpol und den Vorderpol von Eiern im Stadium des zellulären Blastoderms

		Transpl.		1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	Mosaik ges. larval adult		
PK → P-BZ	98	90	14	77	70	61	59	10	-	-	-	-	-
%	100	91.9	14.3	78.6	71.5	62.3	60.3	10.2					
AK → A-BZ	67	58	5	46	39	14	14	(25)	3	-	-	-	-
%	100	88.5	7.6	70.2	58.2	20.9	20.9	(37.3)	4.6				
	165	148	19	123	109	75	73	(25)	13	-	-	-	-
%	100	89.7	11.5	74.5	66.1	45.4	44.2	(15.2)	7.9				

A = Anteriorer Pol, AK = Kerne aus anteriorem Pol,
BZ = Zelluläres Blastoderm, P = Posteriorer Pol,
PK = Kerne aus posteriorem Pol

Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Tiere, die am Ende des III. Larvenstadiums dem Enzymtest unterworfen wurden

Die in Tabelle 6 aufgeführten Daten dieser Transplantationsserie ergaben Überlebensraten, die denen der zuvor beschriebenen zweiten Transplantationsserie (Tabelle 5) ähnlich waren, sie für das Stadium der geschlüpften 1. Larven sogar um 7 - 10 % übertrafen. Eier im Blastodermstadium, bei denen Kerne in den Hinterpol injiziert wurden, zeigten höhere Überlebensraten als Eier im Blastodermstadium, denen Kerne in den Vorderpol injiziert wurden. Hierbei wäre zu berücksichtigen, daß im zuletzt genannten Fall 25 Tiere = 37.3 % der Tiere am Ende des 3. Larvenstadiums getötet und dem Aldehyd-Oxidase-Test unterworfen wurden. Diese 37.3 % ergäben, zu den 20.9 % adulten Tieren dieser anterioren Transplantationsserie dazugezählt, eine Überlebensrate von 58.2 % für Puppen und adulte Fliegen, was geringfügig unter 60.3 % an adulten Fliegen bei der posterioren Transplantation läge.

Die Defektraten für Larven und Adulte waren bei Injektion der Kerne in den Hinterpol der Empfänger etwa doppelt so hoch wie bei Injektionen der Kerne in den Vorderpol. Analog den Verhältnissen bei der zuvor beschriebenen Transplantationsserie wäre, verglichen mit anterioren Transplantationen, hier zu vermuten, daß Injektionen von Fremdmaterial in den Hinterpol von Blastodermstadien weniger häufig zu Störungen führten, die das Überleben der Tiere beeinflussten, häufiger jedoch zu Störungen, die sich als Larval- oder Adultdefekte manifestierten.

In keinem der $y w f^{36a}$ mal Empfängertiere, die als zelluläre Blastodermstadien mwh e Blastodermkerne injiziert erhielten, konnte larvales oder adultes Mosaikgewebe nachgewiesen werden. Eier, die bereits ein zelluläres Blastoderm gebildet hatten, schienen demnach nicht in der Lage zu sein, fremde Blastodermkerne in das eigene Gewebe zu integrieren.

3.2.1.2 Transplantation von Blastodermzellen

Blastodermzellen wurden aus verschiedenen Regionen von mwh e Embryonen entnommen und in einer ersten Versuchsserie in den Hinterpol von $y w f^{36a}$ mal Embryonen im zellulären Blastodermstadium transplantiert. Als Spenderregion dienten sowohl die homotope Region des Hinterpols, als auch heterotope Regionen, d.h. Regionen, die nicht der Empfängerregion entsprachen (Tabelle 7).

Als heterotope Spenderregionen wurden solche ausgewählt, die auf der Eioberfläche eine relativ große Entfernung von der Empfängerregion hatten. Um festzustellen, ob sich Blastodermzellen in ihrer Entwicklungs- und Integrationskapazität bereits voneinander unterscheiden, abhängig von der jeweiligen Position im Blastoderm, sollten Zellen transplantiert werden, die möglichst wenig Gemeinsamkeiten mit den Zellen der Empfängerregion aufweisen; auf der Blastodermoberfläche weit voneinander entfernt liegende Zellen würden dem vermutlich am ehesten entsprechen. Für die Transplantationen von 5 - 8 Blastodermzellen in den Hinterpol wurden folgende heterotopen Spenderregionen verwendet: der vordere Polbereich, der Ventralbereich 0.66 Eilänge (posteriorer Pol = 0, anteriorer Pol = 1), der Lateralbereich 0.66 Eilänge und der Dorsalbereich 0.66 Eilänge.

Als potentiell homotoper Region wurden aus der bereits invaginierten hinteren Mitteldarmanlage von *mwh* e Gastrulationsembryonen Zellen entnommen und in den Hinterpol von zellulären Blastoderm-Empfängereiern transplantiert (P_I Z $\rightarrow$ P-BZ).

Tabelle 7: Entwicklungspotenz von Blastodermzellen nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Stadium des zellulären Blastoderms

	Transpl.	1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	Mosaik		
									ges.	larval	adult
heterotop											
A Z $\rightarrow$ P-BZ		297	265	49	215	189	175	160	28	38	3
	%	100	89.4	16.5	72.5	63.6	59.0	53.9	9.4	12.8	1.0
V Z $\rightarrow$ P-BZ		138	124	7	109	107	101	98	10	9	-
	%	100	89.8	5.1	78.8	77.5	73.1	71.0	7.2	6.5	6.5
L Z $\rightarrow$ P-BZ		170	155	14	135	122	112	110	10	7	-
	%	100	91.2	8.2	79.5	71.8	66.0	64.7	5.9	4.1	4.1
D Z $\rightarrow$ P-BZ		106	100	9	79	74	72	71	8	8	3
	%	100	94.3	8.5	74.5	69.7	67.8	67.0	7.5	7.5	2.8
P_I Z $\rightarrow$ P-BZ		96	83	8	60	53	51	49	8	5	1
	%	100	85.5	8.3	62.5	55.2	53.0	51.0	8.3	5.2	1.0
heterotop total											
$\rightarrow$ P-BZ		807	728	87	598	545	511	488	64	67	7
	%	100	90.2	10.8	74.1	67.5	63.3	60.5	7.9	8.3	0.9
homotop											
P Z $\rightarrow$ P-BZ		159	141	12	114	108	105	105	7	50	2
	%	100	89.8	7.5	71.8	68.0	66.1	66.1	4.4	31.3	1.3
heterotop + homotop											
$\rightarrow$ P-BZ		966	869	99	712	653	616	593	71	117	9
	%	100	898	10.2	73.6	67.5	63.7	61.4	7.3	12.1	0.9

in den Tabellen 7 - 12 verwendete Abkürzungen:

A = Anteriorer Pol, A_L = Anteriore Lateralregion, BZ = zelluläres Blastoderm, D = Dorsalregion
 L = Lateralregion, P = Posteriorer Pol, PB = Präblastoderm, P_I = posteriore Invagination von
 Gastrulationsembryonen, P_L = posteriore Lateralregion, V = Ventralregion, Z = Zellen,
 0.5 = Eimitte.

Bei einer Schlüpftrate der 1. Larven von ca. 90 % entwickelten sich ca. 60 % der Tiere zu adulten Fliegen, bei Defektraten von larval 10.2 % bzw. adult 7.3 %. Diese Werte entsprachen in etwa den Überlebens- und Defektraten, die sich nach Transplantation von Präblastodermkernen in den Hinterpol zellulärer Blastodermstadien ergaben (Tabelle 6). Die Art des injizierten Fremdmaterials, ob Präblastodermkerne oder Blastodermzellen, hat für die Entwicklung des Eies augenscheinlich nur untergeordnete Bedeutung.

Die Überlebensraten für Adulte zeigten für die einzelnen Unterserien zum Teil erhebliche Unterschiede, die kaum mit der Herkunft des Spendermaterials zu erklären sind. Dies könnte höchstens für Zellen aus der hinteren Mitteldarmanlage von Gastrulationsembryonen (Tabelle 7, P_I) zutreffen, die ca. 2 Stunden älter waren als die Blastodermspender. In dieser Unterserie waren die Überlebensraten von den 1. Larven bis zu den adulten Fliegen die niedrigsten.

Mosaikbereiche in larvalen und adulten Geweben wurden insgesamt in 12.1 % der Tiere gefunden. Große Unterschiede ergaben sich allerdings für homotope (Hinterpol → Hinterpol) und heterotope (verschiedene Regionen → Hinterpol) Transplantationen. In 31.3 % der Tiere aus den homotopen Hinterpol → Hinterpol Transplantationen konnte Spendermaterial als Mosaikgewebe nachgewiesen werden, während bei den heterotopen Transplantationen insgesamt nur bei 8.3 % der Tiere Mosaikgewebe gefunden wurde. Einen relativ hohen Anteil von Tieren mit Spendermaterial (12.8 %) ergaben die heterotopen Transplantationen Vorderpol → Hinterpol.

Blastodermzellen aus einer Spenderregion, die räumlich und im Entwicklungsstadium der Empfängerregion entsprach, blieben häufiger im Empfängerembryo erhalten und wurden integriert als Blastodermzellen aus Spenderregionen, die räumlich (oder in der Entwicklung) weiter entfernt waren von der Empfängerregion. Der relativ hohe Prozentsatz (12.8 %) von Mosaiktieren nach der heterotopen Vorderpol → Hinterpol Transplantation müßte durch zusätzliche Annahmen erklärt werden (siehe Kapitel 3.2.3.3).

Des weiteren wurden je 5 - 8 Blastodermzellen aus verschiedenen Eiregionen in den Vorderpol von zellulären Blastodermstadien transplantiert. Als Spenderregionen dienten wiederum sowohl die homotope Region des Vorderpols als auch heterotope Regionen (Tabelle 8). Aus folgenden heterotopen Regionen von mwh e Embryonen wurden Zellen aus dem zellulären Blastoderm entnommen: aus dem Hinterpolbereich, aus dem Ventralbereich 0.66 Eilänge, aus dem Lateralbereich 0.66 Eilänge und aus dem Dorsalbereich 0.66 Eilänge.

Tabelle 8: Entwicklungspotenz von Blastodermzellen nach Transplantation in den Vorderpol von Eiern im Stadium des zellulären Blastoderms

	Transpl. 1.Larve defekt 2.Larve 3.Larve Puppe Adulte defekt							Mosaike ges. larval adult			
heterotop P Z → A-BZ	154	137	11	89	83	32	30 ^{x)}	5	18	11	7
% 100	89.1	7.1	57.8	54.0	20.8	19.5 ^{x)}	3.2	11.6	7.1	4.5	
V Z → A-BZ	108	96	5	83	80	72	68	13	6	1	5
% 100	88.8	4.7	76.8	74.1	66.6	63.0	12.0	5.5	0.9	4.6	
L Z → A-BZ	143	128	19	94	85	71	67	14	5	1	4
% 100	89.5	13.3	65.8	59.5	49.6	46.9	9.8	3.5	0.7	2.8	
D Z → A-BZ	58	47	7	33	29	26	25	3	2	1	1
% 100	81.0	12.0	56.9	50.0	44.8	43.1	5.2	3.4	1.7	1.7	
heterotop total → A-BZ	463	408	42	299	277	201	190	35	31	14	17
% 100	88.1	9.0	64.6	59.8	43.4	41.0	7.6	6.7	3.0	3.7	
homotop A Z → A-BZ	108	95	4	78	73	27	27 ^{xx)}	4	19	16	3
% 100	87.8	4.1	72.2	67.5	25.0	25.0 ^{xxx)}	3.7	17.1	14.3	2.8	
heterotop + homotop → A-BZ	571	503	46	377	350	228	217 ^{xx)}	39	50	30	20
% 100	88.1	8.0	66.0	61.3	39.9	38.0 ^{xxx)}	6.8	8.7	5.2	3.5	

P Z → A-BZ ^{x)} 50 Tiere = 32.5 % am Ende des 3. Larvenstadiums getötet und Aldehyd-Oxidase-Test unterworfen

A Z → A-BZ ^{xx)} 46 Tiere = 42.5 % am Ende des 3. Larvenstadiums getötet und Aldehyd-Oxidase-Test unterworfen

ges. Zellen → A-BZ ^{xxx)} 96 Tiere = 16.8 % am Ende des 3. Larvenstadiums getötet und Aldehyd-Oxidase-Test unterworfen

88.1 % der Embryonen entwickelten sich zu 1. Larven, und 61.3 % erreichten das 3. Larvenstadium. In den beiden Serien Hinterpol → Vorderpol und Vorderpol → Vorderpol wurde ein Teil der Tiere am Ende des 3. Larvenstadiums getötet und dem Aldehyd-Oxidase-

Test unterworfen, um den Anteil larvaler innerer Mosaik festzustellen, der bei ungestörter Entwicklung zu Adulten nicht zu erfassen wäre. Der Anteil an Tieren, der sich zu Fliegen entwickelte, lag dadurch bei nur 38 %; rechnete man die 96 vorzeitig getöteten Tiere (= 16.8 %) dazu, so ergäbe sich für das Adultstadium eine Überlebensrate von 54.8 %, ein Wert, der den bisher verzeichneten Überlebensraten für Fliegen in etwa entspräche.

Die Defektraten für Larven und Adulte wichen von denen für Hinterpol-Blastodermempfänger (Tabelle 7) nicht sehr stark ab. Lediglich die Serie Ventralbereich → Vorderpol zeigte eine stark erhöhte adulte Defektrate von 12 %, bei einer gleichzeitig relativ niedrigen larvalen Defektrate von 4.7 %. Für die Serien Hinterpol → Vorderpol und Vorderpol → Vorderpol ergaben sich niedrigere adulte Defektraten (3.2 % und 3.7 %); doch ist hier zu berücksichtigen, daß bei diesen beiden Serien 32.5 % bzw. 42.5 % der Tiere bereits im 3. Larvenstadium getötet wurden, und deshalb der Prozentsatz der adulten Tiere (19.5 bzw. 25 %) nicht der eigentlich zu erwartenden adulten Überlebensrate von ca. 50 - 60 % entspricht. Korrigiert man die adulte Defektrate um eine ca. 30 - 40 % höhere Überlebensrate an Fliegen, so ergeben sich Werte, die bei 8 - 9 % adulter Defektrate liegen, und damit den Werten anderer Serien vergleichbar sind.

Der Anteil der Tiere, bei denen nach Injektionen von markierten Blastodermzellen in den Vorderpol Mosaikgewebe in Larven und Adulten gefunden wurde, lag bei 8.7 %. Auch hier fiel auf, daß die Häufigkeit, mit der Mosaikgewebe nachgewiesen werden konnte, bei der homotopen Transplantationsserie Vorderpol → Vorderpol wesentlich größer war (17.1 %) als bei den heterotopen Transplantationen (6.7 %). Innerhalb der heterotopen Transplantationen zeigte die Serie Hinterpol → Vorderpol mit 11.6 % den weitaus höchsten Anteil an Tieren mit Mosaikgewebe. Das gleiche Ergebnis wurde bei der reziproken Transplantationsserie Vorderpol → Hinterpol (Tabelle 7) erhalten.

In einer dritten Transplantationsserie wurden je 5 - 8 Blastodermzellen aus dem Vorderpolbereich in die ventrale, laterale

Tabelle 9: Entwicklungspotenz von Blastodermzellen aus dem Vorderpol nach Transplantation in die Mitte von Eiern im Stadium des zellulären Blastoderms

		Transpl.	1.Larve defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte defekt	Mosaik ges. larval adult			
A Z → 0.5 V-BZ	169	144	24	106	86	79	74	19	20	2	18
	% 100	85.3	14.2	62.8	50.8	46.8	43.7	11.2	11.8	1.2	10.6
A Z → 0.5 L-BZ	149	129	18	98	80	73	63	17	20	1	19
	% 100	86.6	12.0	65.8	53.6	49.0	42.2	11.4	13.4	0.7	12.7
A Z → 0.5 D-BZ	120	102	12	79	64	61	56	22	16	1	15
	% 100	85.2	10.4	62.6	54.8	50.8	46.6	18.3	13.3	0.8	12.5
	438	375	54	277	230	213	193	58	56	4	52
	% 100	85.6	12.3	63.2	52.5	48.6	44.0	13.2	12.8	0.9	11.9

und dorsale Eimitte (0.5 Eilänge) transplantiert (Tabelle 9). Die Überlebensrate für 1. Larven lag bei dieser Transplantationsserie mit 85.6 % wenig unter denen für Hinterpol- und Vorderpolinjektionen (Tabelle 7 und 8). Ein relativ großer Anteil der Tiere erreichte jedoch das 2. und 3. Larvenstadium nicht. Von den $y w f^{36a}$ mal Eiern, die im zellulären Blastodermstadium in die Eimitte Injektionen von Blastodermzellen aus dem Vorderpolbereich erhalten hatten, entwickelten sich 52.5 % zu 3. Larven, 48.6 % verpuppten sich und nur 44 % der Tiere entwickelten sich zu Fliegen. Damit lag die Überlebensrate für Fliegen aus dieser Transplantationsserie um 10 - 17 % unter der für Tiere aus Vorderpol- und Hinterpoltransplantationen, die als Larven getöteten Tiere bei der Vorderpolserie eingerechnet. Die Defektraten sowohl für Larven (12.3 %) als auch für Adulte (13.2 %) lagen bei Tieren aus Transplantationen in die Eimitte relativ hoch. Dies und die niedrigeren Überlebensraten weisen darauf hin, daß Injektionen von Fremdmaterial in die Eimitte größere Störungen im Entwicklungsablauf hervorriefen als Injektionen in den Hinterpol- oder Vorderpolbereich.

Von Spenderzellen abstammendes Mosaikgewebe konnte in Larven und Adulten bei 12.8 % aller Tiere nachgewiesen werden. Dieser Wert lag für heterotope Transplantationen, und um solche handelte es sich bei der Vorderpol → Eimitte Transplantationsserie, verhältnismäßig hoch, insbesondere beim Vergleich mit den fast reziproken Transplantationen 0.66 Eilänge Ventralbereich → Vorderpol, 0.66 Eilänge Lateralbereich → Vorderpol und 0.66 Eilänge Dorsalbereich → Vorderpol (Tabelle 8). Die

Mosaikraten lagen dort zwischen 3.4 % und 5.5 %. Ähnlich hohe Anteile an Tieren mit Mosaikgewebe fanden sich unter den heterotopen Transplantationen nur bei den Vorderpol → Hinterpol (12.8 %) und Hinterpol → Vorderpol (11.6 %) Transplantationen.

In einer Versuchsserie geringeren Umfangs wurden je 5 - 8 mwh e Blastodermzellen aus dem vorderen und hinteren Lateralbereich (0.8 Eilänge und 0.15 Eilänge), in den hinteren Lateralbereich (0.15 Eilänge) zellulärer Blastodermstadien von y w f^{36a} mal Embryonen transplantiert (Tabelle 10). Die Überlebensraten der Tiere aus Transplantationen in den posterioren Lateralbereich erwiesen sich als die niedrigsten, verglichen mit denen aller anderen Zelltransplantationen ins zelluläre Blastodermstadium.

Tabelle 10: Entwicklungspotenz von Blastodermzellen nach Transplantation in die posteriore Lateralregion von Eiern im Stadium des zellulären Blastoderms

		Transpl.	1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	Mosaik ges. larval adult		
P_L	$Z \rightarrow P_L$ -BZ	109	86	17	51	44	39	38	5	8	-	8
	% 100		79.8	15.6	46.8	40.4	35.8	34.9	4.6	7.3		7.3
A_L	$Z \rightarrow P_L$ -BZ	87	69	13	47	32	32	31	4	5	3	2
	% 100		79.4	15.0	54.0	36.9	36.9	35.7	4.6	5.7	3.4	2.3
		196	155	30	98	76	71	69	9	13	3	10
		% 100		79.0	15.3	50.0	38.8	36.2	35.2	4.6	6.6	1.5 5.1

Nur 79 % der Empfängerembryonen entwickelten sich zu 1. Larven bei einer gleichzeitig hohen Defektrate von 15.3 %. Das Adultstadium erreichten gar nur 35.2 % der Tiere, bei einer niedrigen adulten Defektrate von 4.6 %. Der posteriore Lateralbereich auf 0.15 Eilänge reagierte also noch empfindlicher auf die Injektion von Fremdmaterial im zellulären Blastodermstadium als die ventrale, die laterale und die dorsale Eimitte. Möglicherweise wurden durch das Vorhandensein von Fremdmaterial an dieser Stelle besonders wichtige und sensible Entwicklungsabläufe gestört. Denkbar wäre z.B. eine Beeinträchtigung der Gastrulationsvorgänge (im 4 - 5 Stunden alten Embryo), die sich zeitlich an die Bildung des zellulären Blastoderms anschließen und den posterioren Eibereich umgestalten.

Der Anteil der larvalen und adulten Tiere, bei denen vom Spender herrührendes Mosaikgewebe nachgewiesen werden konnte, lag bei 6.6 %. Die Mosaikhäufigkeiten waren bei den beiden Unter-
serien wenig verschieden. Der Wert für die homotope Transplantation posteriorer Lateralbereich → posteriorer Lateralbereich lag mit 7.3 % geringfügig höher als der für die heterotope Transplantation anteriorer Lateralbereich → posteriorer Lateralbereich (5.7 %). Auf die unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens von Mosaikgewebe bei Larven und Adulten in den einzelnen Transplantationsserien wird in dem späteren Kapitel 3.2.3.3 näher eingegangen.

Tabelle 11: Entwicklungspotenz von Blastodermzellen aus verschiedenen Regionen nach Transplantation in verschiedene Regionen des zellulären Blastoderms - Zusammenfassung der Ergebnisse

	Transpl.	1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	Mosaik		
									ges.	larval	adult
Zellen → P-BZ (Tabelle 7)	966 % 100	869 89.8	99 10.2	712 73.6	653 67.5	616 63.7	593 61.4	71 7.3	117 12.1	9 0.9	108 11.2
Zellen → A-BZ (Tabelle 8)	571 % 100	503 88.1	46 8.0	377 66.0	350 61.3	228 39.9	217 ^{x)} 38.0 ^{x)}	39 6.8	50 8.7	30 5.2	20 3.5
A-Zellen → 0.5BZ (Tabelle 9)	438 % 100	375 85.6	54 12.3	277 63.2	230 52.5	213 48.6	193 44.0	58 13.2	56 12.8	4 0.9	52 11.9
P+A Zellen → P _L -BZ (Tabelle 10)	196 % 100	155 79.0	30 15.3	98 50.0	76 38.8	71 36.2	69 35.2	9 4.6	13 6.6	3 1.5	10 5.1
gesamt	2171	1902	229	1464	1309	1128	1072 ^{x)}	177	236	46	190
B Z → BZ	% 100	87.6	10.5	67.4	60.3	51.9	49.4 ^{x)} (+4.4)	8.2	10.9	2.1	8.8
Kontrolle	206 % 100	191 92.7	8 3.9	165 80.1	159 77.2	155 75.3	154 74.8	7 3.4	-	-	-

^{x)} 96 Tiere am Ende des 3. Larvenstadiums getötet und Aldehyd-Oxidase-Test unterworfen, = 16.8 % (Tabelle 8) bzw. 4.4 % im Gesamtergebnis

In Tabelle 11 wurden die Ergebnisse der Transplantation von Zellen der verschiedenen Empfängerregionen (Tabellen 7 - 10) und die Ergebnisse einer Kontrollserie, bei der die y w f^{36a} mal Eier nur entchorionisiert und getrocknet wurden, zusammengestellt. Ein Vergleich des in Tabelle 11 erhaltenen Gesamtergebnisses aus allen Transplantationen mit der Kontrollserie ergibt signifikante Unterschiede bezüglich der Überlebens- und Defektraten. Bei der Kontrollserie vollendeten über 90 % der Tiere die Embryonalentwicklung und schlüpften als 1. Larve, bei einer

Defektrate von 3.9 %. Bei der Transplantationsserie entwickelten sich zwar nur ca. 5 % weniger Tiere zur 1. Larve, bei einer mehr als doppelt so hohen Defektrate von 10.5 %, jedoch bis zum 2. Larvenstadium war der Anteil der überlebenden Tiere um 13 % niedriger (67.4 %) als bei der Kontrolle (80 %). Etwa drei Viertel aller Kontrolltiere (74.8 %) entwickelten sich zu adulten Fliegen, während von den Eiern, die im zellulären Blastodermstadium Blastodermzellen transplantiert erhielten, nur etwa die Hälfte (49.4 %) das Adultstadium erreichte. Der in der Tabelle 11 angegebene Prozentsatz von 49.4 % Fliegen würde sich um 4.4 % auf 53.8 % erhöhen, falls man die in Tabelle 8 erwähnten 96 Tiere dazurechnete, die am Ende des 3. Larvenstadiums getötet und dem Aldehyd-Oxidase-Test unterworfen worden waren. Die Defektrate für geschlüpfte Fliegen ergab für die Transplantationsserie mit 8.2 % einen mehr als doppelt so hohen Wert wie für die Kontrollserie mit 3.4 %.

Wie zu erwarten, beeinträchtigte die Transplantation von Blastodermzellen in zelluläre Blastodermstadien die Entwicklungschancen dieser Eier in starkem Maße; obwohl nahezu 90 % zur 1. Larve schlüpften, erreichten doch nur zwei Drittel das 2. Larvenstadium und etwa die Hälfte entwickelte sich zu Fliegen. Gleichzeitig stieg die Defekthäufigkeit, verglichen mit der der Kontrolle, um mehr als das Doppelte. Mosaikgewebe wurde bei 10.9 % der Versuchstiere gefunden.

Um die Entwicklungspotenz von Blastodermzellen nach Transplantation in jüngere Embryonalstadien zu testen, wurden je 5 - 8 mwh e Blastodermzellen aus dem Vorderpol und dem Hinterpol in den Hinterpol von $y w f^{36a}$ mal Embryonen transplantiert,

Tabelle 12: Entwicklungspotenz von Blastodermzellen nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Stadium des Präblastoderms

	Transpl.	1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	Mosaik ges. larval adult		
A Z → P-PB	24	22	4	20	17	14	12	3	2	2	-
% 100		91.7	16.7	83.3	70.8	58.3	50	12.5	8.3	8.3	-
P Z → P-PB	55	40	7	34	32	30	29	4	7	2	5
% 100		72.7	12.7	61.8	58.2	54.5	52.7	7.3	12.7	3.6	9.1
	79	62	11	54	49	44	41	7	9	4	5
% 100		78.5	13.9	68.4	62.0	55.7	51.9	8.9	11.4	5.1	6.3

die sich im Stadium des Präblastoderms befanden (Tabelle 12). Die Werte für die Überlebensraten von 1. Larven (78.5 %) und Adulten (51.9 %) nach Injektion von Blastodermzellen lagen geringfügig unter den in Tabelle 5 aufgeführten Werten (Transplantation von Präblastodermkernen ins Präblastoderm, 81.7 % bzw. 58.3 %), doch war die Anzahl der Transplantationen von Blastodermzellen in den Hinterpol von Präblastodermstadien zu gering, als daß die beobachtete Differenz der Überlebensraten als signifikant zu bewerten wäre. Das gleiche gilt für die Unterschiede der Defekthäufigkeiten zwischen den Transplantationen von Blastodermkernen (Tabelle 5) und Blastodermzellen (Tabelle 12) in Embryonen des Präblastodermstadiums.

Von den Spenderzellen abstammendes Mosaikgewebe wurde in insgesamt 11.4 % der Tiere gefunden; nach der "homotopen" Transplantation von Zellen aus dem Hinterpol in den Hinterpol des Präblastoderms ergab sich mit einer Mosaikfrequenz von 12.7 % ein höherer Wert als nach der "heterotopen" Transplantation von Zellen aus dem Vorderpol in den Hinterpol des Präblastoderms, bei der 8.3 % der Tiere Mosaikgewebe zeigten. Dies entspricht den Befunden der Transplantation von Blastodermzellen ins zelluläre Blastoderm.

Das Auftreten von Mosaikgewebe in Larven und Adulten zeigt, daß Zellen aus dem Blastoderm nach Transplantation in ein jüngeres Entwicklungsstadium des Eies, in dem außer den Polzellen noch keine anderen Zellen vorhanden sind, die Fähigkeit behalten, sich zu teilen und sich in den später gebildeten Blastodermzellverband zu integrieren. Die Häufigkeit, mit der Mosaikgewebe nach diesen Transplantationen gefunden wurde, lag allerdings unter der für die entsprechenden Transplantationen von Blastodermzellen in zelluläre Blastodermstadien, (Tabelle 7; 31.3 % für die homotope Hinterpol → Hinterpol Transplantation und 12.8 % für die heterotope Vorderpol → Hinterpol Transplantation).

3.2.1.3 Transplantation von Zellen aus Kultur

In weiteren Transplantationsserien wurden einzelne Zellen (1 - 3 Zellen) der im Ergebnisteil 3.1 (Tabellen 1-3, Abb. 2 - 28) beschriebenen Drosophila Zell-Linien in den Hinterpol von y w f^{36a} mal Empfängereiern transplantiert, die sich im Stadium des Präblastoderms befanden. In einer ersten Experimentserie wurden Zellen relativ junger Zell-Linien verwendet, deren Passagenzahl bei 3 (Zell-Linie Hi₁, Unterlinie N₆, Tabelle 1, Abb. 9, 21) bzw. bei 11 - 12 (Zell-Linie z spl₁, Unterlinie N₆, Tabelle 1, Abb. 8, 24) lag. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 13 aufgeführt. Die Überlebensraten der Tiere aus dieser Transplan-

Tabelle 13: Entwicklungspotenz von Drosophila-Zellen aus Kultur (Zell-Linien, z spl₁ und Hi₁, Tabelle 1) nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Präblastodermostadium

Mosaik												
		Transpl.	1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	ges.	larval adult	
z spl ₁ → P-PB (11./12.)	302	231	24	166	148	139	133	26	14	4	10	
	% 100	76.9	7.9	54.9	49.0	46.0	44.0	8.6	4.6	1.3	3.3	
Hi ₁ → P-PB (3.)	32	28	3	19	17	16	16	1	2	-	2	
	% 100	87.5	9.4	59.4	53.1	50.0	50.0	3.1	6.2		6.2	
		334	259	27	185	165	155	149	27	16	4	12
		% 100	77.5	8.1	55.4	49.4	46.4	44.6	8.1	4.8	1.2	3.6

In Klammern Passagenzahl, in der sich die Zellkulturen befanden.

P = Posteriorer Pol, PB = Präblastoderm

tationsserie sollten den in Tabelle 12 angegebenen vergleichbar sein, da in dieselbe Eiregion von Empfängern gleichen Entwicklungsstadiums transplantiert wurde. Für den Anteil geschlüpfter 1. Larven trifft dies auch zu; für die Überlebensrate der Fliegen ergab sich jedoch nach Injektion von Zellen aus Kultur ein um ca. 7 % niedrigerer Wert: 44.6 % aller Tiere entwickelten sich in dieser Serie zu Fliegen, hingegen 51.9 % bei Transplantation von Zellen des Blastoderms ins Präblastoderm (Tabelle 12).

Die Empfängereier reagierten nicht mit einer vermehrten Ausbildung von Defekten auf die Transplantation von 1 - 3 Zellen aus Kultur: die larvale Defekthäufigkeit (Tabelle 13; 8.1 %) lag unter dem entsprechenden Wert (Tabelle 12; 13.9 %) nach Blastodermzell-Transplantation; die adulten Defekthäufigkeiten (Tabelle 13; 8.1 % und Tabelle 12; 8.9 %) waren gleich. Die für die beiden Spenderzell-Linien z spl₁ und Hi₁ zum Teil beobachteten

Unterschiede in den Überlebens- und Defektraten werden wegen der geringen Anzahl von Hi_1 -Tieren nicht als signifikant gewertet. Aus der Gegenüberstellung der Überlebens- und Defektraten für die in den Tabellen 12 und 13 zusammengestellten Transplantationsserien wäre zu folgern, daß die Injektion von Zellen aus Kultur junger Zell-Linien in den Hinterpol von Eiern im Präblastodermstadium die Embryonalentwicklung nicht wesentlich stärker beeinträchtigt als die Injektion von Blastodermzellen.

Wesentlich andere Daten ergaben sich allerdings nach Transplantation von 1 - 3 Zellen aus Kultur, die von älteren Zell-Linien (34. - 42. Passage) stammten. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 14 zusammengestellt. Bei dieser zweiten Transplantationsserie wurden Zellen der folgenden Zell-Linien verwendet (Tabellen 1 - 3): Sa_1 , Unterlinie N_2 , 39. - 40. Passage (Abb. 6, 25), Sa_1 , Unterlinie N_4 , 39. Passage; $z\ spl_1$, Unterlinie C_1 , 37. Passage (Abb. 8, 24); Hi_1 , Unterlinie N_4 , 40. - 42. Passage (Abb. 9, 21) und $2/10_1$, Unterlinie N_2 , 33./34. Passage (Abb. 13, 19); die Transplantation erfolgte ebenfalls in den Hinterpol von $y\ w\ f^{36a}$ mal Embryonen im Präblastodermstadium.

Tabelle 14: Entwicklungspotenz von Drosophila-Zellen aus Kultur (Zell-Linien Sa_1 , $z\ spl_1$, Hi_1 und $2/10_1$, Tabelle 1) nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Präblastodermstadium

		Transpl.							Mosaik		
		1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	ges.	larval	adult
$Sa_1/N_2 \rightarrow P-PB$	112	88	13	57	43	23	12	2	18	12	6
(39./40.)	% 100	78.5	11.6	50.9	38.4	20.5	10.7	1.8	16.1	10.7	5.4
$Sa_1/N_4 \rightarrow P-PB$	79	53	12	27	17	12	6	2	5	2	3
(39.)	% 100	67.2	15.2	34.2	21.5	15.2	7.6	2.5	6.3	2.5	3.8
$z\ spl_1 \rightarrow P-PB$	33	23	11	5	-	-	-	-	-	-	-
(37.)	% 100	69.7	33.4	15.1							
$Hi_1 \rightarrow P-PB$	217	144	41	67	36	12	6	2	15	14	1
(40.-42.)	% 100	66.4	18.9	30.9	16.6	5.5	2.8	0.9	6.9	6.4	0.5
$2/10_1 \rightarrow P-PB$	125	40	31	19	12	10	7	1	3	-	3
(33./34.)	% 100	32.0	24.8	15.2	9.6	8.0	5.6	0.8	2.4	-	2.4
		566	348	108	175	108	57	31	7	41	13
		% 100	61.5	19.1	30.8	19.1	10.0	5.5	1.2	7.2	2.3

61.5 % aller Eier in dieser Transplantationsserie entwickelten sich zu 1. Larven, 16 % weniger als nach Injektion von Zellen jüngerer Zell-Linien (Tabelle 13), gleichzeitig zeigten mehr als doppelt so viele dieser 1. Larven Defekte, (Defekthäufigkeit 19.1 %). Im weiteren Verlauf der Larval- und Adultentwicklung war für die Transplantation von Zellen aus älteren Kulturen

(Tabelle 14) im Vergleich zur Transplantation von Zellen jüngerer Kulturen (Tabelle 13) eine weitaus geringere Überlebensrate zu verzeichnen. Für das 2. Larvenstadium lag die Überlebensrate nur bei 30.8 % und gar nur 19.1 % aller Tiere erreichten das 3. Larvenstadium. Die Hälfte aller 3. Larven verpuppte sich und davon schlüpfte etwa die Hälfte als Fliegen, so daß sich für das Adultstadium eine Überlebensrate von 5.5 % ergab. Dies entspricht nur einem Achtel der für Zellen aus jungen Kulturen erhaltenen adulten Überlebensrate (Tabelle 13, 44.6 %). Etwa ein Viertel aller adulten Tiere dieser zweiten Transplantationsserie zeigte Defekte. Bei der Transplantation von Zellen aus jungen Kulturen hatte etwa ein Fünftel aller adulten Tiere Defekte gezeigt (Tabelle 13).

Die Einzelwerte für die verschiedenen Spenderzell-Linien differierten zum Teil erheblich hinsichtlich der larvalen und adulten Überlebens- und Defektraten. Diente die Unterlinie N_2 der Zell-Linie Sa_1 als Spender, so ergaben sich sowohl die höchste larvale als auch die höchste adulte Überlebensrate (78.5 % bzw. 10.7 %). Eine wenig über dem Durchschnitt liegende Überlebensrate für adulte Tiere (7.6 %) ergab die Injektion von Zellen der Unterlinie N_4 der Zell-Linie Sa_1 , eine unter dem Durchschnitt liegende von 2.8 % die Injektion von Zellen der Zell-Linie Hi_1 in der 40. - 42. Passage; die Schlüpfraten für Larven entsprachen in beiden Fällen etwa dem Mittel. Die niedrigste larvale Überlebensrate von nur etwa einem Drittel aller injizierten Eier (32 %) wurde nach Injektion von Zellen der Zell-Linie $2/10_1$ beobachtet, die Überlebensrate für die adulten Tiere entsprach hier dem Durchschnitt. Nach Injektion von Zellen der Zell-Linie $z\ spl_1$ in der 37. Passage entwickelte sich zwar ein geringfügig über dem Durchschnitt liegender Anteil von Eiern zur 1. Larve (69.7 %), etwa die Hälfte davon Defekte zeigend, doch keines der Tiere erreichte das 3. Larvenstadium. Die Zahl der Tiere war allerdings in diesem Fall von 33 injizierten Eiern zu klein, als daß hieraus Schlüsse zu ziehen wären.

Das Gesamtergebnis der beiden Transplantationsserien mit Zellen jüngerer und älterer Zell-Linien wurde einer Kontrollserie gegenübergestellt, bei der nur Zellkultur-Medium M3 in den Hinter-

pol von y w f^{36a} mal Empfängereiern im Präblastodermstadium injiziert wurde (Tabelle 15). Das Volumen der injizierten Mediummenge entsprach etwa dem Volumen von 10 Zellen aus Kultur.

Tabelle 15: Entwicklungspotenz von Drosophila-Zellen aus Kultur nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Präblastodermstadium

	Transpl.	1.Larve	defekt	2.Larve	3.Larve	Puppe	Adulte	defekt	ges.	Mosaik	
										larval	adult
Tabelle 13	334	259	27	185	165	155	149	27	16	4	12
	% 100	77.5	8.1	55.4	49.4	46.4	44.6	8.1	4.8	1.2	3.6
Tabelle 14	556	348	108	175	108	57	31	7	41	28	13
	% 100	61.5	19.1	30.8	19.1	10.0	5.5	1.2	7.2	4.9	2.3
	900	607	135	360	273	212	180	34	57	32	25
	% 100	67.4	15.0	40.0	30.4	23.6	20.0	3.8	6.3	3.5	2.8
M3-Injektion + P-PB	118	90	21	65	58	52	50	4	-	-	-
	% 100	76.3	17.8	55.1	49.2	44.1	42.4	3.4			

Die Überlebensraten für 1. Larven (76.3 %) und Fliegen (42.4 %) nach Injektion von reinem Medium M3 waren jenen für die Tiere nach Injektion von 1 - 3 Zellen jüngerer Zell-Linien (3. - 12. Passage; Tabelle 13) gleich. Die Injektion eines 3 - 5 mal so großen Volumens an Medium zeigte demnach auf die Entwicklung der y w f^{36a} mal Empfängereier im Präblastodermstadium keinen nachteiligeren Einfluß als die Transplantation von 1 - 3 Zellen aus Kultur. Im Vergleich zu den nach Transplantation von Blastodermkernen und -zellen in Präblastodermstadien erhaltenen Überlebensraten (Tabellen 5 und 12), die für Larven bei 78 % und für Adulte bei 52 - 58 % lagen, lagen die nach Transplantation von Zellen jüngerer Linien oder nach Mediuminjektion beobachteten Überlebensraten für Larven um ca. 2 % und für Adulte um ca. 10 - 16 % niedriger. Eine Beeinträchtigung insbesondere der Adultentwicklung, hervorgerufen durch die zuletzt genannte Transplantation von Zellen aus Kultur bzw. Injektion von Medium, ist demnach augenfällig. Das Zellkultur-Medium M3, das auch bei der Transplantation von Zellen in geringen Mengen mitinjiziert wurde, wird dem inneren Milieu der Empfängereier hinsichtlich chemischer Zusammensetzung und osmotischer Verhältnisse wohl kaum völlig entsprochen haben, so daß eine toxische Wirkung des Zellkulturmediums anzunehmen ist.

Die Transplantation von 1 - 3 Zellen aus Kultur älterer Zell-Linien (33. - 42. Passage) zeigte jedoch eine so deutlich negative Wirkung auf Embryonal-, Larval- und Adultentwicklung der

Empfänger, daß sie kaum mehr durch eine potentiell leicht toxische Wirkung (siehe oben) des mitinjizierten Zellkulturmediums zu erklären wäre. Hier mögen noch andere Mechanismen eine entscheidende Rolle gespielt haben. Möglicherweise hatten sich die Zellen im Verlauf der Evolution der Zell-Linien so stark verändert, daß sie von den Empfängereiern nicht mehr als *Drosophila*-Zellen erkannt wurden und als Fremdkörper die Entwicklung der Empfänger nachhaltig störten (siehe auch Diskussion).

In der Spalte "Mosaik" der Tabellen 13 - 15 wurde für die Transplantationsserien mit Zellkulturzellen die jeweilige Zahl aller Larven und Fliegen zusammengefaßt, die Implantate oder nicht genauer identifizierbares fremdes Gewebe aufwiesen, das nicht als Defektentwicklung betrachtet werden konnte. Echtes Mosaikgewebe, d.h. differenziertes larvales oder adultes Gewebe mit von Spenderkernen oder Spenderzellen abstammenden markierten Bereichen, wie z.B. beobachtet in den Transplantationsserien der Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2 (dort markiert mit w^+ , f^+ , mal^+ , mwh , e) war nach Transplantation von Zellkulturzellen in keinem der untersuchten Tiere nachzuweisen. Die hier als Mosaiktiere bezeichneten Larven und Fliegen zeigten fremde, z. Teil nekrotisierte Gewebebereiche, überwiegend in der Epidermis und im Mitteldarm, zum Teil in den larvalen Speicheldrüsen oder frei im Abdomen.

Nach Injektion von reinem Zellkultur-Medium M3 wurden keine derartigen "Mosaik" beobachtet (Tabelle 15), hingegen zeigten nach Transplantation von Zellen junger Zell-Linien 4.8 % der Tiere solche Mosaik; nach Injektion von Zellen älterer Zell-Linien lag der entsprechende Wert bei 7.2 % der Tiere.

Die "Mosaikraten" nach Injektion von Zellen verschiedener Zell-Linien waren z. Teil sehr unterschiedlich und vom Mittel stark abweichend: die Injektion von Zellen der Zell-Linie Sa_1 , Unterlinie N_2 (39./40. Passage) führte zu einer "Mosaikrate" von 16.1 % (Tabelle 14), nach Injektion von Zellen der Zell-Linie $2/10_1$ (33./34. Passage) hingegen wurden nur in 2.4 % der Tiere solche "Mosaik" gefunden. Auf die Art der "Mosaik" und ihre Verteilung in Larven und Adulten, abhängig von der Zell-Linie, der die Spenderzellen entstammten, wird in Kapitel 3.2.3.4 näher eingegangen.

3.2.2 Auftreten von Defekten bei den einzelnen Transplantationsserien

Nach mechanischer Verletzung früher Embryonalstadien bei *Drosophila* wurden von verschiedenen Autoren Defekte bei Larven und Adulten gefunden (Howland und Child (1935), Howland und Sonnenblick (1936), Illmensee (1972), Bownes und Sang (1974), Mertens (1977)). Art und Verteilung solcher bei Larven und Adulten beobachteten Defekte wurden von den meisten Autoren als abhängig gesehen von Ort und Schwere der Verletzung, die zumeist mit einem Verlust an Eimaterial einherging.

Bei den hier beschriebenen Transplantationen von Zellen und Kernen in Embryonen, die sich im Furchungs-, im Präblastoderm- bzw. im zellulären Blastodermstadium befanden, trat allerdings nur sehr selten ein nennenswerter Verlust an Eimaterial auf. Dieser Verlust an Eimaterial kann deshalb nicht allein die Ursache für die zum Teil recht hohen Defektraten (Tabelle 16), wie sie bei diesen Transplantationsserien beobachtet wurden, sein. Sicher beeinflussten auch Art und Menge des in die Embryonen injizierten Materials die Ausprägung von Larval- und Adultdefekten. Die beobachteten Larval- und Adultdefekte wurden in Tabelle 16 zusammengestellt. Bei den Larven wurden Defekte des Tracheensystems, der Segmentierung und des Darmsystems erfaßt, bei Adulten wurden die Defekte im Bereich von Kopf, Thorax und Abdomen gezählt.

Der Anteil der 1. Larven, die Defekte aufwiesen, variierte bei den einzelnen Transplantationsserien, ohne erkennbar mit den jeweiligen Schlüpfzeiten zum 1. Larvenstadium korreliert zu sein. Die Häufigkeit larvaler Defekte war abhängig von der Anstich- bzw. Implantationsregion und/oder dem Entwicklungsstadium der Empfängereier. Erhöhte Defektraten wurden nach Transplantation ins Präblastodermstadium beobachtet, mit Ausnahme der Transplantation von Zellen jüngerer Linien ins Präblastoderm. Niedrige Defektraten ergaben sich nach Transplantation ins Furchungsstadium und nach Transplantation in den Vorderpol des zellulären Blastoderms. Für die Häufigkeit adulter Defekte zeigte sich keine Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Empfänger zum

Tabelle 16: Art und Verteilung der Defekte bei Larven und Adulten

Transpl. 1. Larven defekt Tracheen Segmente Darm Adulte defekt Kopf Thorax Abdomen											
A K + P-F (Tabelle 4)	157 %	121 100	12 77.0	6 7.7	6	-	62 39.5	8 5.1	-	-	8
L K + P-PB (Tabelle 5)	115 %	94 100	20 81.7	15 17.4	7	-	67 58.3	12 10.4	-	-	12
P K + P-PB (Tabelle 6)	98 %	90 100	14 91.9	9 14.3	6	1	59 60.3	10 10.2	-	1	9
A K + A-BZ (Tabelle 6)	67 %	58 100	5 88.5	3 7.6	1	2	14 20.9	3 4.6	-	2	2
Zellen + P-BZ (Tabelle 7)	966 %	869 100	99 89.8	92 10.2	13	6	593 61.4	71 7.3	1	9	62
Zellen + A-BZ (Tabelle 8)	571 %	503 100	46 88.1	41 8.0	3	4	217 38.0	39 6.8	10	16	13
A-Zellen + O.5-BZ (Tabelle 9)	438 %	375 100	54 85.6	39 12.3	15	11	193 44.0	58 13.2	-	19	45
Zellen + P _L -BZ (Tabelle 10)	196 %	155 100	30 79.0	26 15.3	4	3MP	69 35.2	9 4.6	1	2	7
Zellen + P-PB (Tabelle 12)	79 %	62 100	11 78.5	9 13.9	2	1	41 51.9	7 8.9	-	-	7
Zellen/Kultur+P-PB (Tabelle 13)	334 %	259 100	27 77.5	21 8.1	7	-	149 44.6	27 8.1	-	2	25
Zellen/Kultur+P-PB (Tabelle 14)	566 %	348 100	108 61.5	87 19.1	28	5	31 5.5	7 1.2	-	-	7
	3587 %	2934 100	426 81.8	348 11.9	92	30 3MP	1495 41.7	251 7.0	12	52	197
M3-Inj. + P-PB (Tabelle 15)	118 %	90 100	21 76.3	17 17.8	5	1	50 42.4	4 3.4	-	2	3
Anstich P-F (Tabelle 4)	83 %	66 100	4 79.5	3 4.8	1	-	48 57.8	3 3.6	-	-	3
Kontrolle (Tabelle 11)	206 %	191 100	8 92.7	8 3.9	-	-	154 74.8	7 3.4	-	1	6

A = Anteriorer Pol, BZ = zelluläres Blastoderm, F = Furchung, K = Kerne, L = Lateralregion
 P = Posteriorer Pol, PB = Präblastoderm, P_L = posteriore Lateralregion, O.5 = Eimitte

Zeitpunkt der Transplantation. Eher war eine Abhängigkeit von der Implantationsregion zu verzeichnen; eine im Vergleich zu anderen Empfängerregionen erhöhte Rate an Adultdefekten wurde zum Beispiel nach Transplantation in die blastodermale Eimitte gefunden.

Wie ein Vergleich der Kontrollserie mit der Anstichserie nahelegt, waren die Defektraten, die bei den hier beschriebenen Transplantationen beobachtet wurden, wohl nur zum Teil durch die mechanische Verletzung und den möglicherweise erfolgten Verlust an Eimaterial bedingt. Wäre das Auftreten von Defekten ausschließlich darauf zurückzuführen, dann sollte die Defektrate nach Anstich den nach Transplantation von Zellen und Kernen beobachteten Defektraten vergleichbar sein. Dies ergab sich aber für die hier besprochenen Versuchsserien nicht: die Defektraten lagen nach Transplantation von Zellen und Kernen sowie nach Injektion von reinem Medium höher als die Defektrate aus der Anstichserie.

Art der Defekte

Unter den insgesamt 3587 Tieren, denen im frühen Entwicklungsstadium Zellen oder Kerne implantiert wurden, wiesen 426 Tiere als Larven Defekte auf. Diese Defekte betrafen überwiegend das Tracheensystem, inklusive der vorderen und hinteren Spirakel (348 Tiere), sowie zum kleineren Teil die larvale Segmentierung (92 Tiere). Eine geringere Anzahl von Tieren (30) zeigte Defekte im Darmsystem und in 3 Fällen waren abnorme Malpighische Gefäße zu beobachten.

Die Defekte im Tracheensystem betrafen vornehmlich die Tracheenstämme, denen ein kleineres oder größeres Stück mit Verzweigungen fehlte. Tiere, deren Empfängerregion der Hinterpol gewesen war, zeigten unterbrochene Tracheenstämme im Bereich der mittleren bis posterioren Abdominalsegmente. Bei Tieren aus diesen Serien fehlte auch häufig einer der beiden posterioren Spirakel, oder es waren beide Spirakel vorhanden, jedoch verkürzt oder verdreht und nicht in der normalen Position. Tiere, denen im Eimittelbereich bzw. am Vorderpol Zellen oder Kerne implantiert

worden waren, wiesen Deletionen meist im Bereich der anterioren Abdominalsegmente bzw. der Thorakalsegmente auf. Unregelmäßigkeiten der larvalen Segmentierung waren ebenfalls abhängig von der Empfängerregion der behandelten Eier. Meist waren ein oder mehrere Segmente spiralgig verwachsen oder es fehlten Bereiche eines oder zweier Segmente.

Anomalien des Darmsystems waren meist nur in extremen Fällen zu erkennen. Zum Teil befanden sich bei frisch geschlüpften 1. Larven noch große ungegliederte Mitteldarmbereiche im Innern der Tiere oder die Larven zeigten am hinteren Körperende kleinere oder größere Ausstülpungen von Darmmaterial. Eine besondere Klasse von Anomalien des Darmsystems stellten die 11 Fälle dar, bei denen nach Transplantation von Zellen in den Eimittelbereich des Blastoderms in den Larven überdimensional proliferierende vordere Mitteldarmbereiche gefunden wurden; 9 der Larven stammten aus Transplantationen in die ventrale Eimitte (V O.5) und 2 aus Transplantationen in die laterale Eimitte (L O.5). Betroffen war in allen Fällen der vorderste Mitteldarmbereich, der unmittelbar an den Proventrikel anschließt, bisweilen erstreckte sich der vergrößerte Bereich bis in die Basis einer oder auch mehrerer Caeca hinein (Abb. 29, S. 66). Diese Larven wuchsen durchwegs sehr langsam; sie konnten meist das 3. Larvenstadium erreichen, in dem sie verharnten. In 3 Larven, die sich nach Transplantation von Zellen in den posterioren Lateralbereich des Blastoderms entwickelten, wurden abnorme Malpighische Gefäße gefunden, letztere waren in diesen drei Fällen nicht als lange fädige Gebilde zu erkennen, sondern sie sahen knotig verkürzt aus.

Bei 251 Tieren aus den Transplantationsserien wurden im adulten Stadium Defekte gefunden. Der Großteil der defekten Fliegen (197) zeigte Anomalien im Abdominalbereich, ein kleinerer Teil (52) hatte irreguläre Strukturen des Thorax und nur wenige Adulte (12) wiesen defekte Kopfbereiche auf. Letztere stammten fast alle aus Transplantationen in den Vorderpol des Blastoderms, einer Region, die wohl unter den hier verwendeten Empfängerregionen den prospektiven Kopfbereichen der adulten Fliege am nächsten lag (vergl. Anlageplan der Adultstrukturen nach Janning, 1976). Häufig fehlte diesen defekten Tieren ein Teil der rechten oder linken Kopfkapsel einschließlich Auge und Teilen der Antenne; einige Fliegen wiesen nur ein

verkleinertes Auge und/oder eine reduzierte Antenne auf, bei 2 Fliegen waren die Freßwerkzeuge (Labium und Palpen) teilweise reduziert.

Defekte des Thorax waren relativ am häufigsten zu finden nach Transplantationen in den Vorderpol und in die Eimitte von Blastodermstadien. Die meisten Thorax-Defekte betrafen die 1. - 3. Beinpaare, wobei im allgemeinen nur das rechte oder nur das linke Bein fehlte oder Anomalien zeigte, wie z.B. Veränderungen in Größe und Proportionen von Tarsus, Tibia und Femur. Bei 5 Fliegen fehlte äußerlich zwar eines der Beine, dieses war aber als nicht evaginierte Struktur im Thorax vorhanden. In 2 Fällen zeigte eines der Beine partielle Verdoppelungen. Abnorm gestaltete oder fehlende Flügel und Defekte der dorsalen Thoraxkapsel (Scutum und Scutellum) wurden seltener beobachtet; bei einigen Fliegen erschienen solche Defekte zusätzlich zu Anomalien des 2. Beinpaars. Meist fehlte der rechte oder linke Flügel, bisweilen begleitet vom Verlust der ganzen rechten oder linken Thoraxhälfte.

Von den 197 Fliegen, die Defekte im Abdominalbereich aufwiesen, stammten die meisten aus Transplantationsserien, in denen Zellen in den Hinterpol bzw. die Eimitte von Blastodermstadien implantiert worden waren. Überwiegend wurden Anomalien der Abdominalsegmente 2 - 6 beobachtet, sowohl des dorsalen Bereichs (Tergite) als auch, etwas seltener, des ventralen Bereichs (Sternite). Zumeist fehlten eines oder mehrere Tergite einer Körperhälfte ganz oder auch teilweise. Bisweilen lagen zwar alle Halbtergite vor, waren aber über 2 oder 3 Segmente spirallig verwachsen. Tiere, bei denen die Eimitte als Empfängerregion gedient hatte, wiesen Abdominaldefekte nur im Tergit- und Sternitbereich auf und dies überwiegend in den vorderen bis mittleren Abdominalsegmenten. Tiere, denen Blastodermzellen oder -kerne in den Hinterpol oder den posterioren Lateralbereich implantiert worden waren, zeigten im Adultstadium außer Tergit- und Sternitdefekten (etwa zwei Drittel aller beobachteten Defekte) auch noch Anomalien der inneren und äußeren Geschlechtsorgane sowie vereinzelt des Darmsystems und der Malpighischen Gefäße. Etwa 10 % der defekten Fliegen aus diesen Serien hatten Defekte verschiedener Abdominalsysteme.

Von den 25 Fliegen mit Abdominaldefekten, die nach Transplantation von Kulturzellen jüngerer Zell-Linien in den Hinterpol des Präblastoderms beobachtet wurden, hatten etwa die Hälfte abnorme innere Geschlechtsorgane, weitere 3 Tiere zeigten Anomalien der äußeren Geschlechtsorgane und nur 10 Tiere (40 %) wiesen Defekte im Tergit- und Sternitbereich auf. Die Implantation von Kulturzellen jüngerer Zell-Linien in den Hinterpol beeinträchtigte demnach die Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane in relativ stärkerem Maße als die von Blastodermzellen oder -kernen in diesselbe Region.

Ein hoher Anteil an Fliegen mit Abdominaldefekten - ein Drittel der defekten Tiere - wurde bei den Adulten gefunden, denen im Blastodermstadium Zellen in den Vorderpol implantiert worden waren. Es waren ausschließlich Tergite und Sternite betroffen. Solche abdominalen Defekte waren nach Implantation von Fremdmaterial in den Vorderpol entsprechend den morphogenetischen Anlageplänen für *Drosophila* (Garcia-Bellido und Merriam, 1969; Janning, 1976) nicht zu erwarten gewesen. Denkbar ist, daß ein Teil der Eier durch die vorbereitenden Arbeitsgänge des Entchorionisierens und des Trocknens verletzt oder soweit in der Entwicklung beeinträchtigt wurde, daß die Ausbildung von Adultstrukturen nicht ungestört verlief. Ein Teil der Defekte, die eigentlich "nicht erwartet" waren, wie z.B. Kopf- und Thoraxdefekte nach Implantation am Hinterpol (neben oben genannten Abdominaldefekten bei Vorderpolempfängern) ist möglicherweise durch die Manipulation verursacht worden. Für Larvaldefekte kann ebenfalls angenommen werden, daß ein Teil der Defekte auf gleiche Weise durch Verletzung der Eier während der vorbereitenden Arbeitsgänge entstand.

3.2.3 Auftreten von Mosaikgewebe bei den einzelnen Transplantationsserien

3.2.3.1 Ansprechbarkeit von Mosaikgewebe

Die Entwicklungspotenz von Zellen und von Kernen aus verschiedenen Eiregionen und verschiedenen Entwicklungsstadien sollte durch die Transplantation in frühe Entwicklungsstadien des *Drosophila*-Eies festgestellt werden. Wenn die Kerne oder Zellen des Spenders zum Zeitpunkt der Transplantation determiniert sind, dann sollten sie sich im Wirt entwickeln und herkunftsgemäß differenzieren. Sind hingegen implantierte Kerne oder Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation nicht für eine bestimmte Entwicklungsrichtung determiniert, sind sie also pluri- oder gar totipotent, dann sollten sich zumindest einige der transplantierten Kerne oder Zellen in Form von genetischen Mosaiken, integriert im Empfängergerewebe, nachweisen lassen.

Gewebe, das von Spendermaterial abstammt, sei es nun im Empfängergerewebe integriert oder nicht, läßt sich nur nachweisen, wenn Spenderkerne bzw. -zellen geeignete genetische Markierungen tragen, die es erlauben, Fremdgerewebe von der Empfängerumgebung zu unterscheiden. Als Markierungen der Chitin-Außenstrukturen wurden gewählt:

	Spender	Empfänger
Körperfarbe	e ebony = schwarz	y yellow = gelb
Augenfarbe	+ Wildtyp = rot (gelbe Malpighische Gefäße und Hoden)	w white = weiß (unpigmentierte Malpighische Gefäße und Hoden)
Borsten und Haare	mwh multiple wing hairs = Flügelhaarzellen mit mehr als 1 Haar	f forked = kurz und geknickt

Mit Ausnahme von white sind diese Markierungen nicht geeignet, Fremdgerewebe in inneren Organen nachzuweisen.

Daher wurde ein y w f Empfängerstamm verwendet, der die zusätzliche Markierung mal = maroon-like trug. Der Wildtyp mal⁺ zeigt in verschiedenen inneren Organen durch geeignete Färbung nachweisbare Aldehyd-Oxidase-Aktivität, die der Mutante mal fehlt.

Gewebe, das von mal^+ Spenderkernen oder -zellen abstammt, sollte demnach in inneren Organen nach Aldehyd-Oxidase-Reaktion als dunkler Fleck in einer ungefärbten Umgebung nachweisbar sein (siehe Material und Methoden, Absatz 2.2.3). Das Strukturgen "Aldox" des Enzyms Aldehyd-Oxidase wurde von Dickinson (1970) auf dem III. Chromosom lokalisiert. Die Aktivität des Enzyms wird jedoch auch durch das auf dem X Chromosom liegende Gen mal maroon-like beeinflusst. Tieren dieses Genotyps fehlen neben der Aldehyd-Oxidase-Aktivität auch die Aktivitäten der Enzyme Xanthin-Dehydrogenase und Pyridoxal-Oxidase (Dickinson, 1975). Janning (1974) zeigte, daß sich die Aldehyd-Oxidase als autonomer Zellmarker für die Analyse innerer Organe bei Larven und Adulten von *Drosophila* eignet.

In Strukturen des Chitinaußenskeletts sollte vom Spendermaterial abstammendes Gewebe infolge der dunklen Pigmentierung und der langen geraden Borsten vom Empfängergerewebe mit der gelben Körperfärbung und den kurzen geknickten Borsten abzugrenzen sein. Für Augen und Flügel wurden darüber hinaus zusätzliche Marker verwendet (s.o.). Zu den Chitinstrukturen, in denen Mosaikbereiche erkennbar sein sollten, gehörten die larvalen Mundhaken und die Chaeten der larvalen Segmente, sowie bei den adulten Tieren das Außenskelett von Kopf (inklusive Augen, Antennen und Mundwerkzeuge), Thorax (inklusive Beine, Flügel und Halteren) und Abdomen (Tergite, Sternite und externe Genitalien). Mosaikbereiche, die larvale und adulte Chitinstrukturen betrafen, waren im allgemeinen gut anzusprechen. Nicht auszuschließen ist allerdings, daß sehr kleine Mosaikflecken, die nur eine oder wenige Zellen umfaßten, zum Teil unerkant blieben.

Von Spenderkernen oder -zellen abstammendes Gewebe konnte naturgemäß nur in den Organen nachgewiesen werden, deren Zellen die entsprechenden Gene der Mutanten oder des Wildtyps exprimierten. Insbesondere im Bereich der inneren Organe von Larven und Adulten war dies von Bedeutung. Als einzige Markierung für innere Organe stand hier die Mutation mal zur Verfügung (w white konnte noch als zusätzliche Markierung der Malpighischen Gefäße und Hoden dienen). Die Aktivität des Enzyms Aldehyd-Oxidase ist nicht in allen inneren Organen von Larven und Adulten des Wild-

typs nachweisbar. Bei Wildtyp-Larven läßt sich Aldehyd-Oxidase-Aktivität beobachten im Darm, den Malpighischen Gefäßen und den Gonaden (Janning, 1975) sowie in den Imaginalanlagen und Histo-blasten (Sprey, 1977; Kuhn und Cunningham, 1978; Kuhn et al. 1983). Ein Teil dieser larvalen Organe (Darm und Imaginalanlagen) zeigt Enzymaktivität nicht in allen Zellen, z.B. bleiben der hintere Teil des Mitteldarms und der größte Teil des Enddarms sowie die Augenanlagen des Wildtyps beim Enzymtest ungefärbt. In mal Empfänger kann daher in diesen Bereichen Gewebe, das von Spenderkernen oder -zellen abstammt, nicht nachgewiesen werden.

Ähnliches gilt für die Aktivitätsmuster des Enzyms bei Adulten des Wildtyps. Aldehyd-Oxidase-Aktivität findet sich hier in den Malpighischen Gefäßen, im Darm und den inneren Genitalien (Dickinson, 1971; Janning 1974). Innerhalb der beiden zuletzt genannten Organsysteme fehlt eine Enzymaktivität in Zellen des vordersten Mitteldarms, des hinteren Mitteldarms und des Enddarms sowie des Ductus ejaculatorius. Andererseits werden der Kropf und ein schmaler Bereich der Cardia sowie die Samenpumpe auch in Fliegen des mal Mutantenstammes angefärbt. Diese Bereiche, die auch beim Empfängerstamm nach Enzymtest angefärbt werden und die Bereiche, die im Wildtyp keine Enzymaktivität zeigen, eignen sich demnach nicht für die Untersuchung von Mosaikgewebe. Larvales und adultes Nerven- und Muskelgewebe zeigen beim Wildtyp keine Aldehyd-Oxidase-Aktivität, vom Spendermaterial abstammende Zellbereiche waren daher in diesen Organen - bei der hier verwendeten Spender-Empfänger-Kombination - nicht zu erkennen.

Aus dem zuvor Gesagten ist zu schließen, daß mit Hilfe der Markierung mal nur ein Teil der potentiell von Spenderkernen oder -zellen abstammenden Zellbereiche in Larven und Adulten erfaßt werden konnte. Die Anteile an Tieren, die fremde Kerne oder Zellen in ihrem Gewebe integriert hatten, lagen vermutlich höher als die für die einzelnen Serien tatsächlich registrierten. Außerdem läßt sich so teilweise erklären, warum Mosaik des larvalen und adulten Darmsystems überproportional häufig zu beobachten waren; in den Darmbereichen der Empfänger waren kleinste Einheiten, nämlich sogar Einzelzellen, als Mosaikflecken erkennbar, da eindeutig angefärbt (Abb. 45, 67).

3.2.3.2 Mosaike nach Transplantation von Präblastodermkernen

Die Transplantation von Präblastodermkernen in Drosophila-Eier verschiedener Entwicklungsstadien führte nur in einer Serie zu einer nachweisbaren Integration von Spenderkernen im Empfänger. Wurden die Kerne in Präblastoderm- und zelluläre Blastodermstadien transplantiert, fanden sich unter den untersuchten Tieren keine Larven oder Adulte mit Mosaiken (vergl. Tabellen 5 und 6).

Tabelle 17: Mosaike nach Transplantation von Präblastodermkernen in den Hinterpol von Furchungsstadien

	Transpl.	Mosaik	Darm	Malpigh.	Gef.	Abdomen	Fettk.	Gonaden	Externe Genitalien
Larven	121 77.0	6 3.8	4	3	3	-	1	-	
Adulte	62 39.5	13 8.3	9	7	2	2	6	1	
gesamt	157 %	19 100	13	10	5	2	7	1	

Die nach Transplantation von Präblastodermkernen aus dem Vorderpolbereich in den Hinterpol von Furchungsstadien gefundenen Mosaik

sind in Tabelle 17 nach den Bereichen, in denen sie beobachtet wurden, aufgelistet. Viele Tiere waren Mehrfachmosaik

9 Tiere zeigten Mosaikflecken in nur je einem Organ, bei 5 bzw. 4 Tieren ließ sich von den Spenderkernen abstammendes Gewebe in 2 bzw. 3 Organsystemen nachweisen, und bei einem der Tiere fanden sich Mosaikbereiche gar in 5 verschiedenen Organsystemen (Darm, Malpighische Gefäße, abdominale Segmente, Gonaden und externe Genitalien). Alle Tiere zeigten Mosaikbereiche ausschließlich in abdominalen Organen. Mosaik

im Kopf oder Thorax wurden nach Transplantation von Blastodermkernen in den Hinterpol von Furchungsstadien nicht gefunden.

Bei 13 der 19 Mosaikt

iere wurden gefärbte Bereiche im Mitteldarm beobachtet, demnach wurde bei ca. zwei Drittel der Tiere mit Fremdgewebe zumindest einer der transplantierten Blastodermkerne im prospektiven Mitteldarmbereich integriert. Die Mosaikflecken im Mitteldarm waren meist relativ groß (ca. 40 - 80 Zellen) und im posterioren Teil des Mitteldarms lokalisiert.

Mosaik nach Transplantation von mal^+ Präblastodermkernen aus dem Vorderpol in den Hinterpol von $y\ w\ f^{36a}$ mal Eiern im Stadium der Furchung (Abb.30-34).



Abb.29. Stark vergrößerter larvaler vorderer Mitteldarm (Pfeil) nach Transplantation von Vorderpolzellen in die ventrale Eimitte des Blastoderms. (Balken entspricht 100 µm, soweit nicht anders angegeben.)



Abb.30. mal^+ Gewebe im hinteren Mitteldarm (MD) und in den Malpighischen Gefäßen (MP), Enddarm (ED) ebenfalls gefärbt; Aldehyd-Oxidase-positive Zellen sind dunkel gefärbt.

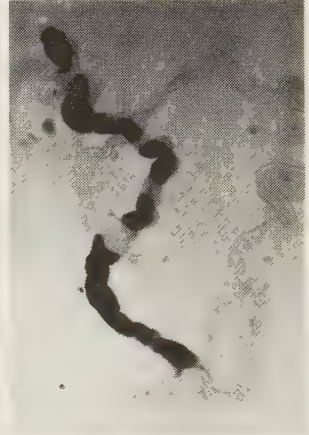


Abb.31. Malpighische Gefäße, von denen eines Aldehyd-Oxidase-positive (dunkel gefärbte) Zellen aufweist.



Abb.32. e Borsten im Bereich der Analplatten (Pfeil) in einer $y\ w\ f^{36a}$ Umgebung.



Abb.33. mal^+ Gewebe (dunkel gefärbt) in den distalen Enden (Pfeile) und in den basalen Windungen der Hoden.



Abb.34. Alle Ovariolen beider Ovarien zeigen Aldehyd-Oxidase-Reaktion, mal^+ Gewebe auch in den Malpighischen Gefäßen.

Abb. 30 zeigt den posterioren Mitteldarm eines Weibchens, der einen großen gefärbten Bereich aufweist; auch der Enddarm ist am Übergang zum Mitteldarm angefärbt. Ein Paar der Malpighischen Gefäße hatte ebenfalls Mosaikcharakter (zwei voneinander getrennte Mosaikflecken).

Von Spenderkernen abstammende Zellen wurden bei etwa der Hälfte der Mosaiktiere auch in Malpighischen Gefäßen nachgewiesen. (Abb. 30, 31). Es waren zumeist einzelne Zellen eines Gefäßes gefärbt, die gefärbten Bereiche unterbrochen von ungefärbten. In Abb. 31 zeigt nur eines der Gefäße eines Paares Mosaikcharakter, der gemeinsame Ausführgang zum Darm und das zweite Gefäß blieben ungefärbt.

Die Integration markierter Spenderkerne in Bereiche, die sich zu Kutikularstrukturen des Abdomes entwickelten, wurde bei etwa einem Drittel der Mosaiktiere beobachtet. In Abb. 32 ist das posteriore Abdomen eines Weibchens abgebildet, dessen Analplatten in der $y f^{36a}$ markierten Umgebung des Empfängers mehrere mwh e Borsten aufwiesen; die 4. bis 6. Tergite waren gleichzeitig defekt, sie waren nur je als Halbtergite vorhanden.

Im Fettkörper wurden gefärbte Zellbereiche nur in zwei Fällen sicher angesprochen; der Fettkörper zeigte nach Aldehyd-Oxidase-Test auch in mal Tieren vereinzelt eine schwache Färbung, weshalb Mosaikflecken in diesem Organ nur in eindeutig anzuspreekenden Fällen gewertet wurden.

mwh e Präblastodermkerne, transplantiert in den Hinterpol von Furchungsstadien, wurden teilweise auch in Polzellen integriert und in den Gonaden von $y w f^{36a}$ mal Larven und Adulten nachgewiesen. Larvale Gonaden sowie Ovarien und Hoden der Imagines von mal^+ Stämmen färben sich nach Enzymtest deutlich an, die larvalen und adulten Gonaden von mal Tieren dagegen nicht. Gefärbte Gonaden in einer ungefärbten Umgebung wurden bei einer Empfängerlarve beobachtet, und bei 6 Fliegen fanden sich Mosaik der Ovarien und Hoden (4 Weibchen, 2 Männchen). Bei beiden Männchen hatten die Hoden Mosaikcharakter, d.h. gefärbte Bereiche befanden sich neben ungefärbten. Abb. 33 zeigt die inneren Genitalien eines dieser Männchen, die distalen Enden und

die Bereiche der basalen Windungen der beiden Hoden sind dunkel gefärbt, Nebenhoden, Vasa deferentia und der unpaarige Ductus ejaculatorius blieben ungefärbt (letzterer färbt sich ja auch in mal⁺ Stämmen nicht an).

Von den 4 y w f^{36a} mal Weibchen, die gefärbte Ovarien besaßen, hatten 2 Weibchen Ovarienpaare, bei denen jedes Ovarium Mosaikcharakter zeigte, d.h. gefärbte Ovariolen lagen neben ungefärbten. Ein drittes Weibchen besaß nur ein entwickeltes Ovarium, welches total gefärbt war (Oocyten, Nährzellen plus Follikelzellen). Beim vierten Weibchen waren alle Ovariolen beider voll entwickelter Ovarien nach Enzymtest gefärbt (Abb. 34). Dieses Weibchen wies vom Spender abstammende Zellbereiche auch im Mitteldarm, den Malpighischen Gefäßen (Abb. 34), den Kutikularstrukturen des Abdomens (Analplatten) und im Gonopod auf. Für 3 der Weibchen und eines der Männchen ließen sich die mwh e Spenderkerne als in der Keimbahn funktionierend nachweisen; in der Nachkommenschaft dieser Tiere, gekreuzt mit mwh e Partnern, fanden sich mwh e Nachkommen unter den erwarteten Wildtyp- und y w f^{36a} mal Nachkommen (einige Rekombinanten eingeschlossen).

Diese Ergebnisse wie auch die anderer Autoren (Zalokar, 1971, 1973; Okada et al., 1974, 1980; Illmensee, 1976) zeigen, daß Präblastodermkerne aus dem Vorderpolbereich, wenn sie in den Hinterpol von Furchungsstadien transplantiert werden, dort integriert werden können und später als Mosaikflecken in verschiedenen Geweben von Larven und Adulten nachzuweisen sind. Am häufigsten mußte die Integration solcher Spenderkerne in den prospektiven Bereichen für Mitteldarm und Malpighische Gefäße erfolgt sein, gefolgt von dem Eibereich, der die Gonaden liefert und wohl größtenteils von den Polzellen gebildet wird. Nach entwicklungsbiologischen Studien, sowohl histologischer Art (Poulson, 1950) als auch solcher mit dem Raster-Elektronenmikroskop (Turner und Mahowald, 1976, 1977) sind die Anlagen für den hinteren Mitteldarm, den Enddarm, die Malpighischen Gefäße und die Gonaden am Eihinterpol lokalisiert. Demzufolge wäre eine Integration von Spenderkernen, die in den Eihinterpol transplantiert wurden, in diesen Organanlagen am wahrscheinlichsten.

3.2.3.3 Mosaik nach Transplantation von Blastodermzellen

Im Gegensatz zur Potenz von Blastodermkernen, an der Entwicklung von Larval- und Adultstrukturen in anderen Körperregionen teilzunehmen, wird für Blastodermzellen eine Restriktion ihrer Entwicklungspotenz angenommen, dergestalt, daß Zellen aus der anterioren Eihälfte nur mehr anteriore Larval- und Adultstrukturen und Zellen aus der posterioren Eihälfte nur mehr posteriore Strukturen bilden können (Chan und Gehring, 1971). Blastodermzellen, wenn transplantiert in Empfängerier im Blastodermstadium, sollten demnach im Empfängergerewebe nur integriert werden, wenn die Empfängerregion einen ähnlichen Determinationszustand besitzt wie die Herkunftsregion. Im anderen Fall wäre eine autonome Entwicklung der Spenderzellen zu erwarten. Die im folgenden zu beschreibenden Mosaiktieri, die nach Transplantation von Blastodermzellen auftraten, zeigten sowohl Integration der Spenderzellen im Empfängergerewebe, als auch autonome Entwicklung der Spenderzellen; doch, wie sich zeigen wird, war die Integration von Zellen im Empfängergerewebe nicht ausschließlich auf die Fälle beschränkt, bei denen Übereinstimmung von Spender- und Empfängerregion vorlag.

Die nach Transplantation von Blastodermzellen ins zelluläre Blastoderm beobachteten Mosaikie wurden in den Tabellen 18 - 21 nach Art und Verteilung zusammengestellt. Die ersten Spalten enthalten jeweils die absoluten Zahlen an Larval- und Adultmosaiktieren sowie die entsprechenden Prozentsätze. Die folgenden Spalten zeigen auf, in welchen larvalen und adulten Geweben Spenderzellen integriert waren; nicht integrierte Strukturen, die in Larven und Adulten gefunden wurden, sind in den beiden letzten Spalten verzeichnet. Einige Tiere wiesen Integration von Spenderzellen in mehr als einem Organ auf, oder sie zeigten sowohl Integration als auch autonome Entwicklung von Spendermaterial. Die Anzahl larvaler Mosaiktieri ist im allgemeinen gering, da nur wenige Larven getötet und dem Aldehyd-Oxidase-Test unterworfen wurden.

Transplantationen in den Hinterpol des Blastoderms

Tabelle 18 enthält die Daten für die Versuchsserien, bei denen mwh e Blastodermzellen aus verschiedenen Eiregionen und Gastru-

lationszellen in den Hinterpol des zellulären Blastoderms von $y w f^{36a}$ mal Empfängereiern transplantiert wurden. Der homotopen Spenderregion des Hinterpols wurden die heterotopen Spenderregionen Vorderpol und ventraler, lateraler und dorsaler Bereich (0.66 Eilänge) sowie invaginierter hinterer Mitteldarm von Gastrulationsembryonen gegenübergestellt. Wie bereits in Kapitel 3.2.1.2 erwähnt, waren die Anteile an Mosaiktieren in den einzelnen Versuchserien sehr verschieden, abhängig von der Spenderregion der Zellen.

Tabelle 18: Mosaik e nach Transplantation von Blastoderm- und Gastrulazellen in den Hinterpol des zellulären Blastoderms

	Transpl.	Mosaik e			Darm		mwh e Gewebe integriert			mwh e Gewebe	
		ges.	larval	adult	larval	adult	Malpigh.	Gef.	Gonaden	Genital.	nicht integriert
							adult	adult	adult	adult	larval adult
A Z → P-BZ	297	38	3	35	-	22	-	-	-	-	3 16
		12.8	1.0	11.8							
V Z → P-BZ	138	9	-	9	-	2	-	-	-	-	7
		6.5		6.5							
L Z → P-BZ	170	7	-	7	-	1	-	-	-	-	6
		4.1		4.1							
D Z → P-BZ	106	8	3	5	-	-	-	-	-	-	3 5
		7.5	2.8	4.7							
P _I Z → P-BZ	96	5	1	4	-	2	-	-	-	-	1 2
		5.2	1.0	4.2							
heterotop+P-BZ	807	67	7	60	-	27	-	-	-	-	7 36
%	100	8.3	0.9	7.4							
P Z → P-BZ	159	50	2	48	1	37	2	11	1	1	7
%	100	31.3	1.3	30.0							
Zellen → P-BZ	966	117	9	108	1	64	2	11	1	8	43
%	100	12.1	0.9	11.2							

In den Tabellen 18 - 22 verwendete Abkürzungen:

A = Anteriorer Pol, A_L = Anteriore Lateralregion, BZ = zelluläres Blastoderm, D = Dorsalregion
 L = Lateralregion, P = Posteriorer Pol, PB = Präblastoderm, P_I = posteriore Invagination von
 Gastrulationsembryonen, P_L = posteriore Lateralregion, V = Ventralregion, Z = Zellen,
 0.5 = Eimitte

mwh e Zellen aus dem Vorderpolbereich des zellulären Blastoderms, transplantiert in den Hinterpol, konnten in 12.8 % der $y w f^{36a}$ mal Empfängertiere nachgewiesen werden (davon 11.8 % Imagines und 1 % Larven). 22 der 35 adulten Mosaiktieren zeigten Aldehyd-Oxidase-positive Zellbereiche im Mitteldarm,

darüber hinaus wurde bei keinem anderen Organ eine Integration von Spenderzellen beobachtet. Abb. 35 zeigt den Mitteldarm einer Fliege, bei dem ein relativ großer Zellbereich im mittleren Mitteldarm gefärbt ist. Größe, Form und Position der Mosaikflecken waren sehr unterschiedlich; manche Flecken umfaßten nur wenige Zellen, andere umfaßten bis zu ca. 50 Zellen. Ein loser Zusammenhalt der gefärbten Zellgruppen wie im hier gezeigten Beispiel war die Regel, bisweilen fanden sich aber auch zwei oder mehr völlig getrennte gefärbte Zellbereiche. Die Mosaikflecken wurden im hinteren und mittleren Mitteldarm beobachtet. Bei 3 Larven und 16 Fliegen wurden im Abdomenbereich kleine, nicht integrierte Chitinstrukturen gefunden, die zumindest auf Grund der dunklen Färbung als von mwh e Spenderzellen abstammend klassifiziert wurden (Abb. 36). Borsten und Haare waren nur in einem Teil davon zu erkennen. Eine eindeutige Zuordnung dieser kleinen Implantate zu Chitinstrukturen etwa des adulten Kopfes war hier nicht möglich.

Von den 9 y w f^{36a} mal Imagines (6.5 %), die nach Transplantation von mwh e Blastodermzellen aus dem Ventralbereich (0.66 Eilänge) Spendergewebe aufwiesen, zeigten 2 Tiere gefärbte Zellbereiche (ca. 20 - 30 Zellen) im Mitteldarm (Abb. 37). Bei den übrigen 7 Tieren fanden sich im Abdomen kleine Implantate, 4 dieser Implantate ließen 2 - 4 Borsten erkennen, eines (Abb. 38) schien rötlich gefärbt und 2 Strukturen waren nicht identifizierbar.

Blastodermzellen aus dem Lateralbereich der mwh e Spendereier wurden an 2 leicht unterschiedlichen Stellen entnommen: im vorderen Lateralbereich in 0.66 Eilänge (144 Tiere) und im mittleren Lateralbereich in 0.5 Eilänge (26 Tiere); der Übersichtlichkeit halber wurden diese beiden Unterserien in den Tabellen zusammengefaßt. Insgesamt zeigten 7 adulte y w f^{36a} mal Empfängertiere (4.1 %) Spendergewebe, 6 davon stammten aus der zuerst genannten Unterserie (0.66 Eilänge) und ein Männchen stammte aus der zweiten Unterserie (0.5 Eilänge). Bei diesem Männchen fand sich im Abdomen ein Implantat (Abb. 39), das mwh e Flügelbereiche aufwies. Eines der Tiere aus der ersten Unterserie zeigte mehr als 10 kleine Mosaikflecken im Darm, die jeweils eine bis wenige Zellen umfaßten (Abb. 40); der Darm war zudem irregulär geformt und die inneren und äußeren Genitalien die-

ses Männchens fehlten. Die übrigen 5 Fliegen enthielten im Abdomen kleine Implantate, von denen 2 einzelne Borsten erkennen ließen (Abb. 41) und 3 nicht eindeutig anzusprechen waren.

Für mwh e Blastodermzellen aus dem Dorsalbereich (0.66 Eilänge), transplantiert in den Hinterpol von Blastodermstadien, konnte in keinem Fall eine Integration im Empfängergewebe nachgewiesen werden. Bei 8 Tieren (7.5 %) wurde nicht integriertes Spendermaterial beobachtet. In 2 Fällen (1 Larve, 1 Imago) fand sich Gewebe mit Aldehyd-Oxidase-Aktivität angelagert, jedoch nicht integriert, am Darmgewebe; Abb. 42 zeigt den larvalen Mitteldarm mit einer außerhalb liegenden gefärbten Zellgruppe. Bei einem Weibchen war eine der Spermatheken von dunklem chitinösem Material umgeben (Abb. 43); bei den restlichen Tieren (2 Larven, 3 Imagines) wurden kleine dunkle Chitinstrukturen frei im Abdomen gefunden, sie waren bis auf 2 punktförmige Implantate mit je 1 Borste nicht zu identifizieren.

Die Transplantation von Zellen aus der invaginierten hinteren Mitteldarmanlage von Gastrulationsembryonen führte nur bei 5 Tieren = 5.2 % (1 Larve, 4 Adulte) zu nachweisbarem Mosaikgewebe. 2 Fliegen zeigten Aldehyd-Oxidase-Aktivität in kleineren Bereichen (~ 15 - 25 Zellen) des hinteren Mitteldarms (Abb. 44) und bei den beiden anderen Fliegen fanden sich unterhalb der 6. Terгите kleine chitinöse Vesikel, in denen sich 2 Borsten des mwh e Genotyps erkennen ließen; die im Abdomen der Larve beobachtete Chitinstruktur war nicht identifizierbar. Der Nachweis von Zellen aus Gastrulationsembryonen im Mitteldarm von Tieren, denen diese Zellen im Blastodermstadium implantiert wurden, zeigt, daß Zellen aus dem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium der Gastrulation noch die Fähigkeit besitzen, sich in den Verband der Blastodermzellen zu integrieren und sich mit diesen zu teilen und zu differenzieren.

Von den der Empfängerregion Hinterpol nicht entsprechenden heterotopen blastodermalen Spenderregionen Vorderpol, Ventral-, Lateral- und Dorsalbereich ließen sich mwh e Blastodermzellen aus dem Vorderpol weitaus am häufigsten in den Empfängertieren nachweisen, die Mosaikrate für diese Versuchsserie lag etwa doppelt so hoch wie die der übrigen 3 Serien. Mehr als die Hälfte der Mosaiktiere in der Vorderpol → Hinterpol-Serie zeigten Darmmosaik, bei den

anderen 3 Serien traten Darmmosaikte nur vereinzelt oder gar nicht auf. Vergleicht man hingegen die Anteile an adulten Tieren mit nicht integriertem Spendergewebe, so zeigen diese für alle 4 Serien etwa die gleiche Größenordnung (Vorderpol → Hinterpol 5.4 %). Die erhöhte Mosaikrate nach Transplantation von Vorderpol-Blastodermzellen in den Hinterpol des Blastoderms ging demnach primär auf die große Anzahl von Tieren mit Mosaikgewebe im Darm zurück. Es scheint, als ob Blastodermzellen aus dem Vorderpolbereich bevorzugt in die Mitteldarmanlage am Hinterpol integriert wurden.

Blastodermzellen aus der homotopen Region des Hinterpols wurden ebenfalls bevorzugt im prospektiven Darmmaterial am Hinterpol des Blastoderms integriert. 37 von 48 adulten Mosaiktieren (= 77 %) wiesen Darmmosaikte auf. Die Bereiche mit Aldehyd-Oxidase-Aktivität variierten sehr stark in Form und Größe; einzelne voneinander mehr oder weniger getrennt liegende gefärbte Zellen waren ebenso zu finden (Abb. 45), wie größere zusammenhängende Zellgruppen (Abb. 46, 47). Die Aldehyd-Oxidase-positiven Spenderzellen befanden sich überwiegend im hinteren Mitteldarm (Abb. 45, 46), zum Teil wurden gefärbte Zellgruppen auch im mittleren Mitteldarm beobachtet (Abb. 47). Zwei der adulten Mosaiktiere zeigten Enzymaktivität in den Malpighischen Gefäßen, eines davon hatte zusätzlich im Darm Mosaikgewebe. Im anderen Fall waren nur einzelne Bereiche der Malpighischen Gefäße gefärbt und zwar in den Ausführungsgängen des vorderen und hinteren Gefäßpaares (Abb. 48).

Bei 11 der Imagines mit Spendergewebe ließen sich Mosaikgonaden nachweisen (10 Weibchen, 1 Männchen), bei einem der Weibchen fand sich mwh e Mosaikgewebe auch im Bereich der Vaginalplatten. Bei den meisten dieser adulten Tiere war nur ein Ovarium oder ein Hoden betroffen - nur ein Weibchen besaß Mosaikovariolen in beiden Ovarien. Beim Männchen dieser Gruppe war einer der Hodenschläuche nahe dem distalen Ende in einem kleinen Bereich stark angefärbt (Abb. 49). Bei den Weibchen hatten häufig nur einzelne Eikammern einer oder mehrerer Ovariolen im Enzymtest positiv reagiert (Abb. 50); teilweise zeigten große Bereiche eines Ovariums Aldehyd-Oxidase-Aktivität (Abb. 51); eines der reifen Eier des Mosaikovariums in Abb. 51 (das ungefärbte) schien vom mal Empfänger-Genotyp zu sein, eingehüllt in ein Chorion, das von Follikelzellen sezerniert wurde, die von mal⁺ Spenderzellen abstammten. In keinem der Mosaiktiere wurde ein Ovarium gefunden, bei

dem alle Ovariolen den mal⁺ Spender-Genotyp gezeigt hätten, wie dies z.B. nach Kerntransplantation in den Hinterpol von Furchungsstadien bei zwei Tieren beobachtet wurde (Abb. 34). Aus dem Auftreten von Tieren mit Mosaikgonaden ist zu schließen, daß bei der Transplantation von mwh e Zellen aus dem Hinterpol von Blastodermstadien in den Hinterpol gleich alter y w f^{36a} mal Empfängereier neben Blastodermzellen, die als Vorläufer somatischer Gewebe gelten, auch Polzellen mit transferiert wurden; letztere liefern die Keimbahnzellen, wie von verschiedenen Autoren zweifelsfrei bewiesen wurde (Poulson und Waterhouse, 1960; Illmensee und Mahowald, 1974, 1976; Illmensee et al. 1976; van Deusen 1976; Allis et al., 1979).

Für 6 der 10 Weibchen mit Mosaikovarien konnte ein Funktionieren solcher transplantierte Polzellen in den Gonaden der Empfänger nachgewiesen werden: gekreuzt mit mwh e Partnern fanden sich in der Nachkommenschaft dieser Weibchen mwh e Tiere neben Wildtyp- und y w f^{36a} mal Nachkommen (einige Rekombinanten eingeschlossen).

Nicht im Empfängergewebe integriertes Spendermaterial wurde bei 7 adulten Tieren und einer Larve beobachtet; im letzteren Fall war es nicht näher identifizierbar. Die im posterioren Abdomen der Fliegen gefundenen kleinen chitinösen Vesikel ließen meist 2 - 3 mwh e Borsten erkennen, größere Implantate wurden in dieser Transplantationsserie nicht entdeckt.

Insgesamt wurde in der Hinterpol → Hinterpol-Serie bei ca. einem Drittel aller Empfänger (31.3 %) von mwh e Spenderzellen abstammendes Gewebe registriert, verglichen mit ca. 4 - 7 % bzw. ca. 13 % Mosaiktieren in den Serien, in denen Blastodermzellen aus heterotopen Regionen in den Hinterpol transplantiert wurden. Die deutlich erhöhte Mosaikrate in der Hinterpol → Hinterpol-Serie war ausschließlich durch die gehäuft beobachtete Integration von Spenderzellen im Empfängergewebe bedingt - der Anteil an Tieren mit nicht integriertem Spendermaterial, das sich autonom entwickelte, blieb in allen diesen Versuchsserien etwa gleich. Möglicherweise wurden Zellen aus einer Region, die der Empfängerregion entsprach, zu einem großen Prozentsatz als verwandt erkannt und häufiger in den Zellverband des Empfängers integriert als Spenderzellen aus anderen Regionen.

Transplantation von mwh e Blastodermzellen in den Hinterpol von y w f^{36a} mal Eiern im Blastodermstadium (Abb.35-51); Transplantation von mwh e Blastodermzellen in den Vorderpol von Eiern im Blastodermstadium (Abb.52-58).

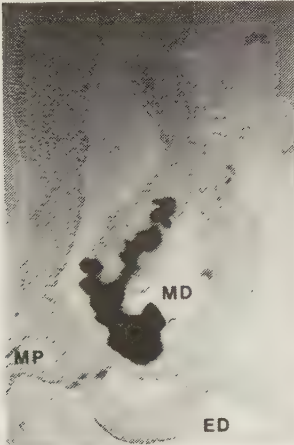


Abb.35. mal⁺ Gewebe (dunkel gefärbt) im mittleren Mitteldarm nach Transplantation von Vorderpolzellen in den Hinterpol

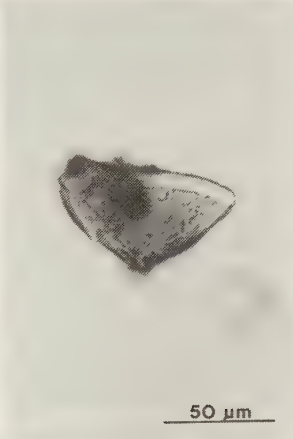


Abb.36. Chitinstruktur nach Transplantation von Vorderpolzellen in den Hinterpol.

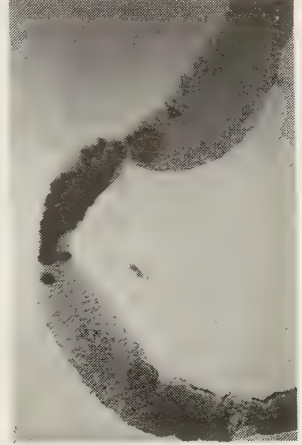


Abb.37. Mitteldarmmosaik nach Transplantation von Blastodermzellen aus dem Ventralbereich (0.66 Eilänge) in den Hinterpol.



Abb.38. Chitinstruktur nach Transplantation von Zellen aus dem Ventralbereich (0.66 Eilänge) in den Hinterpol.

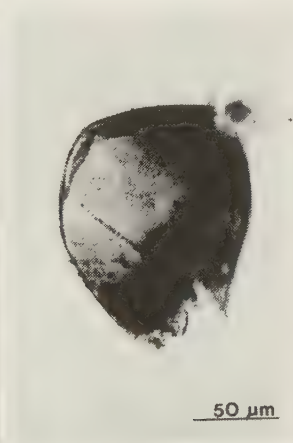


Abb.39. mwh e Flügeltgewebe als Implantat nach Transplantation von Zellen aus der lateralen Eimitte (0.5 Eilänge) in den Hinterpol.



Abb.40. mal⁺ Gewebe im Mitteldarm nach Transplantation von Zellen aus dem Lateralbereich (0.66 Eilänge) in den Hinterpol. Der Mitteldarm ist abnorm geformt und trägt einen sackartig ausgebildeten Teil.

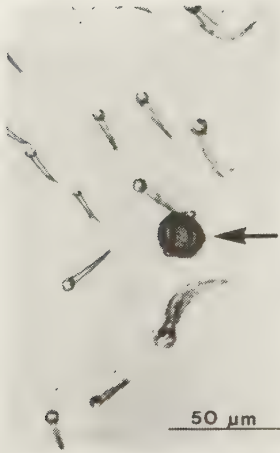


Abb.41. Kleines Implantat mit zwei e Borsten (Pfeil) nach Transplantation von Zellen aus dem Lateralbereich (0.66 Eilänge) in den Hinterpol.

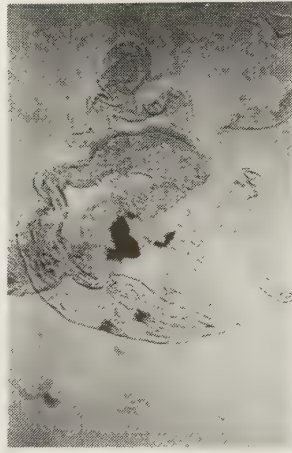


Abb.42. mal⁺ Gewebe (dunkel gefärbt) an larvalen Mitteldarm angelagert, nicht integriert. Blastodermzellen aus dem Dorsalbereich (0.66 Eilänge) transplantiert in den Hinterpol.



Abb.43. Anlagerung von dunklem chitinösem Material an Spermatheka. Blastodermzellen aus dem Dorsalbereich (0.66 Eilänge) transplantiert in den Hinterpol.

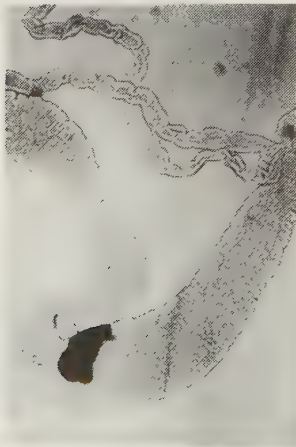


Abb.44. mal⁺ Gastrulazellen aus dem Bereich der hinteren Mitteldarmanlage und des Proctodäums integriert im Mitteldarm nach Transplantation in den Hinterpol.

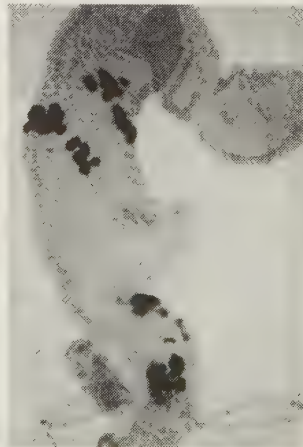


Abb.45. mal⁺ Einzelzellen im hinteren Mitteldarm nach homotoper Transplantation von Hinterpolzellen in den Hinterpol.

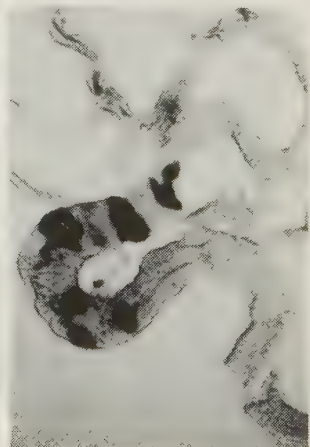


Abb.46. mal⁺ Mosaikflecken im hinteren Mitteldarm nach homotoper Hinterpol → Hinterpol Transplantation.

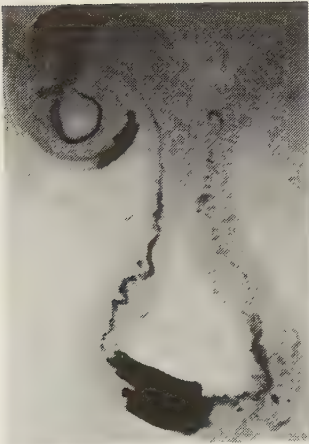


Abb.47. Drei große weit voneinander entfernte mal⁺ Mosaikbereiche (dunkel gefärbt) im hinteren und mittleren Mitteldarm nach Hinterpol → Hinterpol Transplantation.

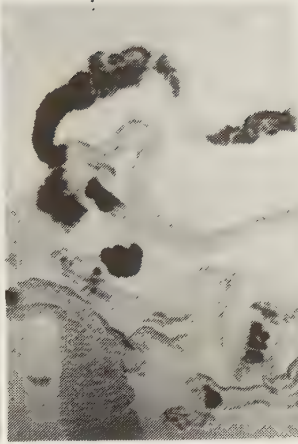


Abb.48. mal⁺ Gewebe in beiden Ausführgängen der Malpighischen Gefäße nach Hinterpol → Hinterpol Transplantation.

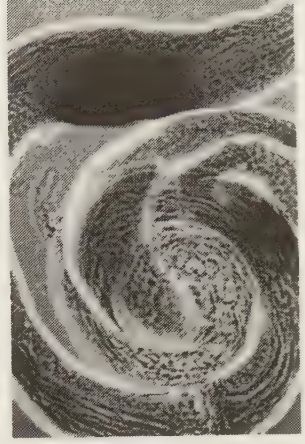


Abb.49. mal⁺ Gewebe im distalen Hodenbereich nach Hinterpol → Hinterpol Transplantation.



Abb.50. mal⁺ Eikammern in mal Ovarien nach Hinterpol → Hinterpol Transplantation.

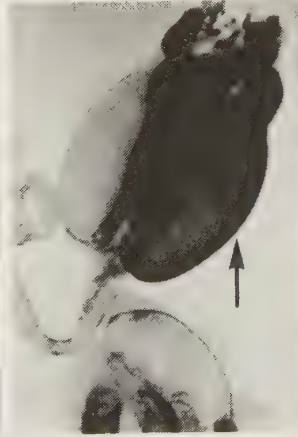


Abb.51. mal⁺ Eikammern in mal Ovarien, Chorion der rechten reifen mal Oocyte von mal⁺ Follikelzellen gebildet (Pfeil), homotope Hinterpol → Hinterpol Transplantation.

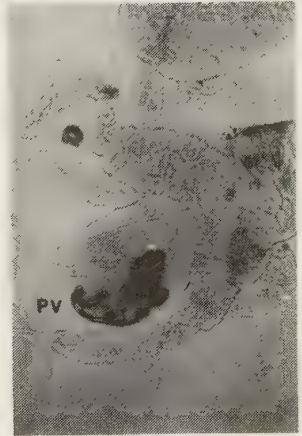


Abb.52. mal⁺ Gewebe im larvalen Proventrikel (PV) nach Transplantation von Hinterpolzellen in den Vorderpol.



Abb.53. e farbene Chitinstruktur nach Transplantation von Hinterpolzellen in den Vorderpol.

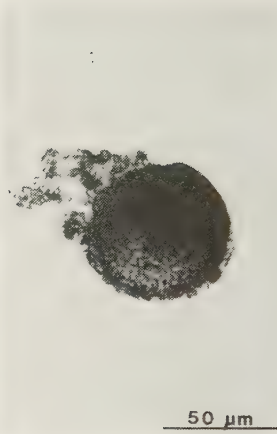


Abb.54. e farbene Chitinstruktur nach Transplantation von Zellen aus dem Ventralbereich (0.66 Eilänge) in den Vorderpol.



Abb.55. Schwarze Flecken an identischen Stellen der Vorderbeincoxen nach Transplantation von Zellen aus dem Ventralbereich (0.66 Eilänge) in den Vorderpol.

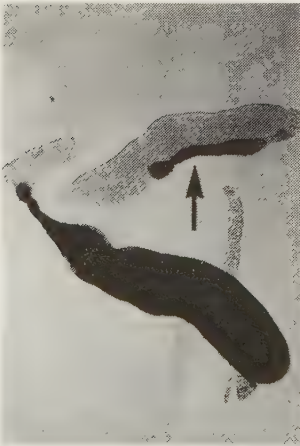


Abb.56. Eine Speicheldrüse des mal⁺ Empfängers zeigt Aldehyd-Oxidase-Aktivität (dunkel gefärbt), Fettkörper unspezifisch angefarbt (Pfeil); Zellen aus dem Lateralbereich (0.66 Eilänge) transplantiert in den Vorderpol.

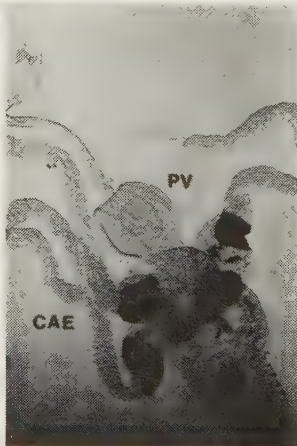


Abb.57. mal⁺ Gewebe im vorderen larvalen Mitteldarm, in Caeca (CAE) hineinragend, nach homotoper Transplantation von Vorderpolzellen in den Vorderpol.



Abb.58. mal⁺ Gewebe im vorderen adulten Mitteldarm nach homotoper Vorderpol → Vorderpol Transplantation, Cardia (CA) unspezifisch angefarbt.

Transplantationen in den Vorderpol des Blastoderms

Transplantationen von mwh e Blastodermzellen aus verschiedenen Eiregionen in den Vorderpol von Blastodermstadien ergaben Mosaikraten, die, ähnlich wie nach Transplantation in den Hinterpol, für die einzelnen Spenderregionen der Zellen deutlich verschieden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Blastodermzellen wurden entnommen aus der homotopen Region des Vorderpols und aus den heterotopen Spenderregionen Hinterpol, sowie Ventral-, Lateral- und Dorsalbereich in 0.66 Eilänge.

Tabelle 19: Mosaike nach Transplantation von Blastodermzellen in den Vorderpol des zellulären Blastoderms

	Transpl.	Mosaik gesamt larval adult			mwh e Gewebe integriert Darm Speichel-Drüse larval adult larval			mwh e Gewebe nicht integriert larval adult	
P Z → A-BZ	154	18	11	7	9	4	-	3	3
%	100	11.6	7.1	4.5					
V Z → A-BZ	108	6	1	5	1	-	-	-	5
%	100	5.5	0.9	4.6					
L Z → A-BZ	143	5	1	4	-	-	1	-	4
%	100	3.5	0.7	2.8					
D Z → A-BZ	58	2	1	1	-	-	-	1	1
%	100	3.4	1.7	1.7					
heterotop→A-BZ	463	31	14	17	10	4	1	4	13
%	100	6.7	3.0	3.7					
A Z → A-BZ	108	19	16	3	16	1	-	1	2
%	100	17.1	14.3	2.8					
Zellen → A-BZ	571	50	30	20	26	5	1	5	15
%	100	8.7	5.2	3.5					

In der Versuchsserie Hinterpol → Vorderpol fand sich von mwh e Spendern abstammendes Gewebe bei 11.6 % aller Empfängertiere. Dies ergibt eine Mosaikrate, die wenig unter der des reziproken Transplantationstyps Vorderpol → Hinterpol (12.8 %) lag. Bei 9 Larven und 4 Fliegen konnte mal⁺ Spendergewebe im Darm nachgewiesen werden. Die Mosaikbereiche umfaßten meist 5-20 Zellen. Bei sämtlichen Imagines befanden sich die Aldehyd-Oxidase-positiven Zellbereiche im vorderen Mitteldarm; die Mosaikflecken im larvalen Darm hatten unterschiedliche Positionen; 6 Larven zeigten mal⁺ Zellen ausschließlich im vorderen Mitteldarm, bei 2 Tieren waren vorderer Mitteldarm und Proventrikel, welcher

als Teil des ektodermalen Vorderdarmes gilt, betroffen, und eine Larve wies nur in Bereichen des Proventrikels Enzymaktivität auf (Abb. 52). Bei 3 Larven und 3 adulten Tieren fand sich Spendergewebe, das nicht in Empfängerewebe integriert war; 2 der Larven zeigten 2 bzw. 3 kleine chitinöse Strukturen im Bereich der ersten zwei Segmente an die Tracheen geheftet, bei der dritten Larve fanden sich nach Enzymtest 2 dunkel gefärbte Zellgruppen, die an das Ventrale Nervensystem geheftet schienen. Zwei der im anterioren Abdomen bzw. Thorax der Fliegen gefundenen Implantate waren flächige chitinöse Strukturen von dunkler(e) Farbe, jedoch ohne erkennbare Haare oder Borsten (Abb. 53), das dritte war ein Vesikel mit 3 Borsten, ähnlich dem in Abb. 41 dargestellten.

Aus dem Ventral-, Lateral- und Dorsalbereich (0.66 Eilänge) entnommene mwh e Blastodermzellen ergaben nach Transplantation in den Vorderpol von y w f^{36a} mal Blastodermempfängern niedrige Mosaikraten von 3.4 - 5.5 %. Integration von Spenderzellen aus diesen Regionen im Empfängerewebe wurde nur sehr selten beobachtet. Nach Transplantation von Zellen aus dem Ventralbereich zeigte eine Larve im vorderen Mitteldarm eine Gruppe von Zellen mit Enzym-Aktivität (~ 20 Zellen). Bei den übrigen 5 Mosaiktieren, ausschließlich Imagines, fanden sich im Thorax kleine chitinöse Implantate, die nicht identifiziert werden konnten; eines davon (Abb. 54) war von kugelförmiger Form und ließ regelmäßige Strukturen auf der Oberfläche erkennen. Ein anderes Tier zeigte an sich entsprechenden Stellen der beiden Coxen des 1. Beinpaars schwarze Bereiche, in denen jedoch keine mwh e Borsten oder Haare zu erkennen waren (Abb. 55).

Gewebe, abstammend von mwh e Spenderzellen aus dem Lateralbereich (0.66 Eilänge), konnte nach Transplantation in den Vorderpol bei 3.5 % aller Versuchstiere nachgewiesen werden. Eine der Larven aus dieser Serie zeigte Speicheldrüsen, von denen nach Enzymtest eine bis auf einen schmalen aktivitätslosen Randbereich gefärbt war, die andere hingegen wies keinerlei Enzymaktivität auf (Abb. 56). Der sich an der Aldehyd-Oxidase-negativen Speicheldrüse entlang ziehende Fettkörper ist unspezifisch angefärbt (siehe Abs. 3.2.3.1).

Die nicht integrierten Chitin-Strukturen, die sich bei 4 adulten Tieren fanden, konnten außer einem Vesikel, das 2 Borsten erkennen ließ, nicht identifiziert werden.

Nach Transplantation von mwh e Blastodermzellen aus dem Dorsalbereich (0.66 Eilänge) wurde bei einer Larve und einer Fliege je eine kleine Chitinstruktur im Bereich des Thorax beobachtet, die jedoch wegen ihrer geringen Größe nicht genau analysiert werden konnten.

Der Anteil solcher kleiner, nicht integrierter chitinöser Implantate, die meist ein sicheres Ansprechen nicht erlaubten, entsprach auch nach homotoper Vorderpol → Vorderpol Transplantation den in den heterotopen Versuchsserien beobachteten Werten; bei einer Larve und 2 Imagines wurden in der Vorderpol → Vorderpol-Serie solche kleinen Strukturen gefunden. Relativ hoch war hingegen der Anteil an Tieren, für die eine Integration von Spenderzellen im larvalen (und adulten) Darm nachgewiesen werden konnte. 12 der 16 Larven, bei denen Darmmosaik beobachtet wurden, hatten gefärbte Zellbereiche ausschließlich im vorderen Mitteldarm, in einigen Fällen setzten sich die Mosaikbereiche auch in die Caeca, die Fortsätze des vorderen Mitteldarms an der Grenze zum Proventrikel, fort (Abb. 57). Es waren meist mehrere, durch Empfängergerewebe voneinander getrennte Zellgruppen unterschiedlicher Größe (von 2 - ca. 20 Zellen). Bei zwei weiteren Larven fand sich Aldehyd-Oxidase-positives Zellmaterial nicht nur im vorderen Mitteldarm, sondern zusätzlich im (ektodermalen) Proventrikel, und für zwei Larven ließ sich die Integration von mal⁺ Spenderzellen nur für Bereiche des Proventrikels nachweisen. Das eine adulte Tier mit Mosaikdarm zeigte einen relativ großen Mosaikfleck im Mitteldarm an einer Stelle, die eindeutig dem vorderen Mitteldarm zuzurechnen war (Abb. 58, die Cardia ist unspezifisch angefärbt).

Für die Gruppe der Zelltransplantationen in den blastodermalen Vorderpol zeichnete sich für die Mosaikraten eine ähnliche Tendenz ab wie für die Gruppe der Transplantationen in den Hinterpol. Die Transplantation von Zellen aus homotopen Regionen ergab jeweils die höchsten Mosaikraten innerhalb einer Gruppe (Hinterpol → Hinterpol 31.3 %, Vorderpol → Vorderpol 17.1 %).

Zellen aus der Vorderpol- bzw. Hinterpolregion, transplantiert in die reziproke Polregion, führten zu Mosaikraten (Vorderpol → Hinterpol 12.8 %, Hinterpol → Vorderpol 11.7 %), die deutlich über den in den übrigen heterotopen Transplantationsserien erzielten Mosaikraten (3.4 - 7.5 %) lagen.

Transplantationen in die Eimitte des Blastoderms

In drei weiteren Versuchsserien wurden mwh e Blastodermzellen aus dem Vorderpol in die ventrale, laterale und dorsale Eimitte (0.5; P = 0.0) von $y w f^{36a}$ mal Blastodermempfängern transplantiert; Tabelle 20 enthält die Daten über die bei diesen Serien gefundenen Mosaikrate. Die Mosaikraten erreichten für alle drei Serien etwa gleiche Werte, die mit durchschnittlich 12.8 % den in den Vorderpol → Hinterpol und Hinterpol → Vorderpol Transplantationsserien erzielten Anteilen nahe kamen.

Tabelle 20: Mosaikrate nach Transplantation von Blastodermzellen aus dem Vorderpol in verschiedene Regionen der Eimitte des zellulären Blastoderms

	Transpl.	Mosaikrate			mwh e Gewebe integriert Darm		Malpigh.Gef. adult	mwh e Gewebe nicht integriert	
		gesamt	larval	adult	larval	adult		larval	adult
A Z → 0.5V-BZ	169	20	2	18	2	14	-	-	4
%	100	11.8	1.2	10.6					
A Z → 0.5L-BZ	149	20	1	19	1	13	-	-	7
%	100	13.4	0.7	12.7					
A Z → 0.5D-BZ	120	16	1	15	1	12	1	-	2
%	100	13.3	0.8	12.5					
	438	56	4	52	4	39	1	-	13
%	100	12.8	0.9	11.9					

mwh e Vorderpolzellen transplantiert in die ventrale Eimitte führten bei 11.8 % aller $y w f^{36a}$ mal Tiere zu Spendergewebe; beim größten Teil der Mosaiktiere wurde Spendergewebe im Darmsystem gefunden (2 Larven, 14 Fliegen; 20 Mosaiktiere insgesamt). Die beiden Larven zeigten Aldehyd-Oxidase-Aktivität in Zellbereichen des vorderen Mitteldarms (ca. 15 - 20 Zellen), eine dieser Larven gehörte zur Gruppe der in Abs. 3.2.2 beschriebenen Tiere, bei denen ein überdimensional proliferierender larvaler vorderer Mitteldarm beobachtet wurde (vergl. Abb. 29). Bei den adulten Tieren wurde mal⁺ Gewebe ebenfalls im Mitteldarm gefunden, bei 2 Tieren nahe der Cardia, also in

Abschnitten des vorderen Mitteldarms. Die übrigen Imagines wiesen gefärbte Zellgruppen in Darmabschnitten auf, die von der Cardia weiter entfernt lagen und wohl größtenteils bereits dem mittleren Mitteldarm zuzurechnen waren. Abb. 59 zeigt einen imaginalen Mitteldarm mit einem kleineren und einem großen Mosaikfleck im Bereich des mittleren Mitteldarms. Die Chitinstrukturen, die bei den 4 adulten Tieren im Thorax und im anterioren Abdomen gefunden wurden, waren nicht anzusprechen. Eine davon (Abb. 60) war von rötlicher Farbe und länglicher Form mit einem inneren Oval, das seinerseits kleine runde Strukturen enthielt.

Die nach Transplantation von Vorderpolzellen in die laterale Eimitte gefundenen Implantate waren teilweise ebenfalls von rötlicher Farbe (Abb. 61), aber wegen ihrer geringen Größe und fehlender Strukturen wie Haare oder Borsten nicht identifizierbar. In 2 Fällen fanden sich im anterioren Abdomen kleine Vesikel mit je 3 Borsten. Eine der Fliegen, die zusätzlich ein Mitteldarmmosaik aufwies, zeigte im linken Flügel einen kleinen dunklen Bereich (Abb. 62), der an den Rändern fädig ausgefranst schien (multiple Haare?). Bei einem Tier fanden sich nach Aldehyd-Oxidase-Test 3 kleine gefärbte Zellbereiche, die an den Mitteldarm geheftet - also nicht im Darmgewebe integriert waren. Integration von mwh e Spenderzellen im Darmgewebe der Empfänger ließ sich für 13 adulte Tiere und eine Larve nachweisen, alle gefärbten Zellbereiche befanden sich im (larvalen und adulten) mittleren Mitteldarm (Abb. 63), mit Ausnahme zweier Flecken, die unmittelbar der Cardia benachbart lagen (1 adultes Tier).

Die Darmmosaik, die nach Transplantation von mwh e Vorderpolzellen in die dorsale Eimitte registriert wurden, betrafen Abschnitte des vorderen bis mittleren Mitteldarms (1 Larve, 12 Imagines). Abb. 64 zeigt den Mitteldarm einer Imago mit 2 kleinen Flecken in einer Region, die noch dem vorderen Mitteldarm zuzurechnen war. Bei einer Fliege aus der Serie Vorderpol → dorsale Eimitte fanden sich Malpighische Gefäße, die gefärbtes Material enthielten. Außerdem waren die Organe abnorm geformt (Abb. 65): eines der Gefäßpaare trug an beiden Gefäßen Ausstülpungen, die eine ballonartig und die andere in T-Form; in beiden Ausstülpungen und in Bereichen des einen Gefäßes ließ

Transplantation von mwh e Blastodermzellen aus dem Vorderpol in die Eimitte von y w f^{36a} mal Eiern im Blastodermstadium (Abb. 59 - 65).



Abb.59. mal⁺ Gewebe (dunkel gefärbt) im mittleren Mitteldarm nach Transplantation von Vorderpolzellen in die ventrale Eimitte (0.5 Eilänge).



Abb.60. Chitinstruktur von rötlicher Farbe; Vorderpolzellen transplantiert in die ventrale Eimitte (0.5 Eilänge).



Abb.61. Implantat nach Transplantation von Vorderpolzellen in die laterale Eimitte (0.5 Eilänge).



Abb.62. Vom mwh e Spender abstammendes Chitinmaterial im linken Flügel eingelagert; Vorderpolzellen transplantiert in die laterale Eimitte (0.5 Eilänge).

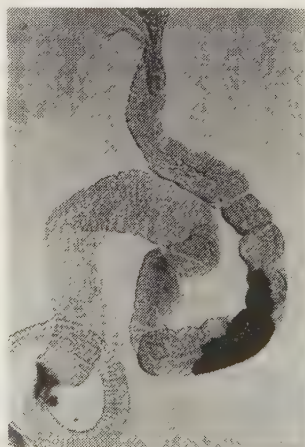


Abb.63. mal⁺ Gewebe im mittleren Mitteldarm nach Transplantation von Vorderpolzellen in die laterale Eimitte

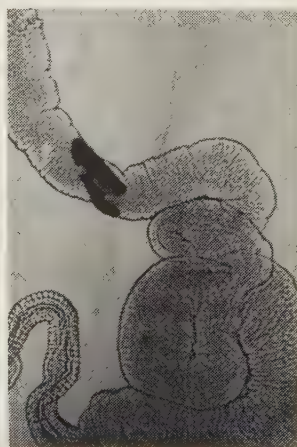


Abb.64. mal⁺ Gewebe im vorderen Mitteldarm nach Transplantation von Vorderpolzellen in die dorsale Eimitte (0.5 Eilänge).

Transplantation von mwh e
Blastodermzellen in die posteriore
Lateralregion von y w f^{36a} mal Eiern
im Blastodermstadium



Abb.65. Einlagerung von mal⁺ Gewebe (dunkel gefärbt) in die Malpighischen Gefäße, die abnorme Ausstülpungen tragen (Pfeile), Vorderpolzellen transplantiert in die dorsale Eimitte (0.5 Eilänge).



Abb.66. mal⁺ Gewebe nicht integriert, sondern an abdominale Organe (Malpighische Gefäße) angelagert (Pfeil), homotope Transplantation von Zellen aus dem posterioren Lateralbereich (0.15 Eilänge) in den posterioren Lateralbereich (0.15 Eilänge).

Transplantation von mwh e Blastodermzellen in den Hinterpol von y w f^{36a} mal Eiern im Präblastodermstadium



Abb.67. mal⁺ Gewebe im Mitteldarm nach Transplantation von Hinterpolzellen in den Hinterpol des Präblastoderms.

sich Aldehyd-Oxidase-Aktivität nachweisen. Die in dorsalen Thoraxbereichen bei 2 Fliegen gefundenen nicht integrierten Chitinstrukturen waren zu klein und kompakt, als daß Einzelheiten erkennbar gewesen wären.

In den zuletzt beschriebenen drei Versuchsserien, in denen mwh e Vorderpol-Blastodermzellen in die heterotopen Regionen ventrale, laterale und dorsale Eimitte (0.5 Eilänge) von y w f^{36a} mal Blastodermstadien transplantiert wurden, waren Mosaikraten von 11.8 - 13.4 % zu beobachten. Diese gegenüber den anderen Versuchsserien mit heterotopen Spenderregionen erhöhten Mosaikraten (Ausnahmen reziproke Pol → Pol Transplantationen) waren bedingt durch eine große Anzahl von Tieren mit Mosaikdarm, ähnlich den Ergebnissen bei den Pol → Pol Transplantationen. Die zu diesen drei Serien näherungsweise reziproken Transplantationen, bei denen Zellen aus dem ventralen, lateralen und dorsalen Eibereich in 0.66 Eilänge in den Vorderpol transplantiert wurden, hatten hingegen nur in einem Fall zu einem Darmmosaik geführt, die Mosaikraten erreichten dort nur Werte zwischen 3.4 und 5.5 %. Bestand etwa zwischen Blastodermzellen aus dem Vorderpol und den Zellen der blastodermalen Eimitte eine größere "Verwandtschaft" (Ähnlichkeit) als zwischen Zellen aus den Blastodermregionen in 0.66 Eilänge und den Zellen des Eivorderpols? Im Diskussionsteil wird der Versuch unternommen, eine (mögliche) Antwort auf diese Frage zu finden.

Transplantationen in den posterioren Lateralbereich des Blastoderms

Tabelle 21: Mosaik nach Transplantation von Blastodermzellen in die posteriore Lateralregion des zellulären Blastoderms

	Transpl.	Mosaik			mwh e Gewebe integriert			mwh e Gewebe	
		gesamt	larval	adult	Darm larval adult	Malpigh. adult	Gef.	nicht integriert larval adult	
F _L 2 → P _L -BZ	109	8	-	8	-	-	1	-	7
	% 100	7.3		7.3					
A _L 2 → P _L -BZ	87	5	3	2		2	-	3	1
	% 100	5.7	3.4	2.3					
	196	13	3	10	-	2	1	3	8
	% 100	6.6	1.5	5.1					

Die beiden Transplantationsserien mit Blastodermzellen, die in den posterioren Lateralbereich (0.15 Eilänge) transplantiert wurden, ergaben Mosaikraten von 7.3 % ($P_L \rightarrow P_L$) bzw. 5.7 % ($A_L \rightarrow P_L$). Die Einzeldaten sind aufgeführt in Tabelle 21. Nach Transplantation von mwh e Blastodermzellen aus der homotopen Region posteriorer Lateralbereich (0.15 Eilänge) ergab sich zwar die etwas höhere Mosaikrate von 7.3 %, doch zeigte, anders als bei den zuvor beschriebenen homotopen Transplantationen, nur eines der 8 Mosaiktiere Integration von mwh e Spenderzellen im y w f^{36a} mal Empfängergerewebe: ein adultes Tier wies Aldehyd-Oxidase-Aktivität in den Malpighischen Gefäßen auf. Bei 6 von den übrigen 7 Fliegen mit Spendergerewebe fanden sich im Abdomen nach Aldehyd-Oxidase-Test kleinere gefärbte Zellhaufen, die mehr oder weniger fest an abdominalen Organen angelagert schienen, z.B. an den Malpighischen Gefäßen (Abb. 66), an Ovidukt oder Spermatheka. Bei einem adulten Tier wurden 2 kleine kompakte Chitinstrukturen unterhalb des 5. Tergits beobachtet, die aber keine Einzelheiten erkennen ließen.

mwh e Spenderzellen aus der vorderen Lateralregion (0.8 Eilänge) transplantiert in die hintere Lateralregion (0.15 Eilänge) ließen sich bei 2 Imagines integriert in den hinteren Mitteldarm nachweisen. 3 Larven und ein adultes Tier zeigten kleine, nicht identifizierbare Chitinstrukturen im posterioren Abdomenbereich (9. - 11. Larvalsegmente bzw. 6. Tergit).

Transplantationen von Blastodermzellen aus Spenderregionen, die der Empfängerregion homotop waren, führten nicht notwendigerweise zu erhöhten Mosaikraten, wie die Transplantationsserie posteriorer Lateralbereich $\rightarrow$ posteriorer Lateralbereich zeigte. "Verwandschaft" von Spender- und Empfängerzellen wäre demnach vielleicht eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Integration von Spenderzellen im Empfängergerewebe.

Transplantationen in den Hinterpol des Präblastoderms

Wie weit auch das Stadium des Präblastoderms die Fähigkeit besitzt, Spenderzellen aus dem Blastoderm zu integrieren, wurde in zwei Versuchsserien geringen Umfangs getestet (Tabelle 22).

mwh e Blastodermzellen aus den Bereichen Vorderpol und Hinterpol wurden in den Hinterpol von y w f^{36a} mal Präblastodermempfängern transplantiert.

Tabelle 22: Mosaik e nach Transplantation von Blastodermzellen in den Hinterpol von Präblastodermstadien

	Transpl.	Mosaik e			mwh e Gewebe integriert		mwh e Gewebe nicht integriert	
		gesamt	larval	adult	Darm larval	Darm adult	larval	adult
A Z + P-PB	24	2	2	-	1	-	1	-
%	100	8.3	8.3					
F Z + P-PB	55	7	2	5	2	5	-	1
%	100	12.7	3.6	9.1				
	79	9	4	5	3	5	1	1
%	100	11.4	5.1	6.3				

Nach Transplantation von Vorderpolzellen wurde bei 2 Versuchstieren (8.3 %) Spendergewebe gefunden; eine Larve zeigte 2 Aldehyd-Oxidase-positive Zellgruppen im Mitteldarm und eine Larve wies im posterioren Abdomen 2 kleine nicht identifizierbare dunkle Chitinstrukturen auf. Spenderzellen entnommen aus dem Hinterpol des Blastoderms ließen sich bei 7 Tieren (2 Larven und 5 Adulte = 12.7 %) nachweisen. Bei allen Tieren wurden gefärbte Zellbereiche im Mitteldarm beobachtet, die in der Anzahl von 1 - 5 variierten. Abb. 67 zeigt einen adulten mittleren Mitteldarm mit 5 Mosaikflecken unterschiedlicher Größe (eine bis ca. 15 Zellen). Eine der Fliegen hatte im Abdomen zusätzlich einen kleinen chitinösen Vesikel, in dem zwei e Borsten zu erkennen waren.

Aus dem Auftreten von mwh e Spendergewebe in y w f^{36a} mal Larven und adulten Tieren dieser Versuchsserie ist zu schließen, daß sich Blastodermzellen, wenn sie in den Hinterpol des Präblastoderms transplantiert werden, in das später gebildete Blastoderm des Empfängers zu integrieren vermögen und sich an der Entwicklung von Darmgewebe beteiligen können.

3.2.3.4 Mosaik nach Transplantation von Zellen aus Kultur

Zellen aus Kultur, transplantiert in den Hinterpol von $y w f^{36a}$ mal Präblastodermstadien, ließen sich in keinem der Empfängertiere in der Form echten Mosaikgewebes nachweisen. Die Strukturen, die im Abdomen mancher Tiere gefunden wurden, zeigten weder Borsten noch Haare noch sonstige erkennbare Chitinstrukturen. Der Aldehyd-Oxidase-Test erbrachte in keinem Fall den Nachweis echter Integration solcher Spenderzellen im Empfängergewebe, wie z.B. im vorigen Kapitel für $mwh e$ Blastodermzellen beschrieben. Die Ausgangsstämme der Zell-Linien ($y spl$ Samarkand, $z spl cv$, Hikone und 2/10 Oregon, genaue Beschreibung der Stämme siehe Abs. 2.1.1) trugen das mal^+ Gen, und die inneren Organe mit Enzymaktivität zeigten, wie für den Wildtyp beschrieben, bei allen untersuchten Tieren eine starke Färbung.

Tabelle 23: "Mosaik" nach Transplantation von Zellen aus Kultur in den Hinterpol des Präblastoderms

	Transpl. gesamt	"Mosaik"			Spendergewebe "integriert"						Spendergewebe nicht integriert	
		larval	adult		Darm larval	Speicheldr. adult	Abdomen larval	Abdomen adult			larval	adult
$z spl_1 / 11./12.P.$	302	14	4	10	-	-	2	-	-		2	10
% 100		4.6	1.3	3.3								
$Hi_1 / 3.P.$	32	2	-	2	-	-	-	-	-		-	2
% 100		6.2		6.2								
$Sa_1 / 39./40.P.$	112	18	12	6	2	2	2	4	-		4	4
N_2	100	16.1	10.7	5.4								
$Sa_1 / 39.P.$	79	5	2	3	1	-	-	-	1		1	2
N_4	100	6.3	2.5	3.8								
$z spl_1 / 37.P.$	33	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
% 100												
$Hi_1 / 40.-42.P.$	217	15	14	1	5	1	-	2	-		7	-
% 100		6.9	6.4	0.5								
$2/10_1 / 33./34.P.$	125	3	-	3	-	-	-	-	-		-	3
% 100		2.4		2.4								
gesamt	900	57	32	25	8	3	4	6	1		14	21
% 100		6.3	3.5	2.8								

Die in Tabelle 23 unter dem Begriff "Mosaik" zusammengefaßten Fremdstrukturen, die bei einigen Empfängertieren beobachtet wurden, waren entweder als Teil einzelner Organe oder frei im Abdomen zu finden. Dem entsprechend wurden sie als integriert oder nicht-integriert bezeichnet (analog den in den Tabellen 18 - 22 aufgeführten echten Mosaikgeweben).

Der Durchschnitt der "Mosaikraten" nach Transplantation von 1 - 3 Zellen aus Kultur lag bei 6.3 %; anders als für die Überlebensraten ergab sich hier bei den Spenderzellen aus jüngeren Zell-Linien (z spl₁, 11./12. Passage und Hi₁, 3. Passage) und den Spenderzellen aus älteren Zell-Linien (Sa₁ Unterlinien N₂ und N₄, 39./40. Passage; z spl₁, 37. Passage; Hi₁, 40. - 42. Passage und 2/10₁, 33./34. Passage) kein großer Unterschied. Die eine Ausnahme bildete die Unterlinie N₂ der Zell-Linie Sa₁ (39./40. Passage), für die eine "Mosaikrate" von 16.1 % gefunden wurde. - Die larvalen und adulten Überlebensraten der Empfängertiere lagen nach Transplantation von Zellen dieser Unterlinie ebenfalls höher als die Überlebensraten nach Transplantation von Zellen anderer älterer Zell-Linien (Tabelle 14).

Der überwiegende Teil der Fremdstrukturen fand sich im Abdomen von Larven und Adulten. Es waren meist kleine vesikelförmige oder unregelmäßig geformte Strukturen von brauner bis schwarzer Farbe, die möglicherweise auch nekrotisiertes Gewebe enthielten. Nach Transplantation von Zellen der Zell-Linie z spl₁ in der 11./12. Passage fanden sich bei 10 adulten Tieren solche nicht integrierten Strukturen. Die meisten davon glichen den kleinen Chitinvesikeln, wie sie für die Versuchsserien mit Blastoderm-Spenderzellen beschrieben wurden, nur waren hier keine Einzelborsten zu erkennen. Bei den 2 Larven mit nicht integriertem Material schienen die frei im Abdomen schwimmenden Strukturen kleine Punkte zu sein. 2 Larven zeigten bräunliches, fremdes, im Enzymtest jedoch nicht anfärbares Gewebe in den Speicheldrüsen, ähnlich den in den Abb. 68 und 69 gezeigten Fällen.

Die 2 Fliegen, bei denen nach Transplantation von Zellen der noch jungen Zell-Linie Hi₁, 3. Passage, Fremdmaterial gefunden wurde, hatten kleine dunkle, nadelförmige Strukturen im posterioren Abdomen.

Transplantationen von Zellen der Zell-Linie Sa₁ Unterlinie N₂, in der 39./40. Passage, führten bei 18 Tieren (16.1 %) zu mehr oder weniger auffälligen Fremdstrukturen. Bei 2 Larven und 2 adulten Tieren fand sich im Darm bräunliches Gewebe, das sich

Transplantation von Zellen aus Kultur in den Hinterpol von
y w f^{36a} mal Eiern im Präblastodermstadium (Abb. 68 - 73)

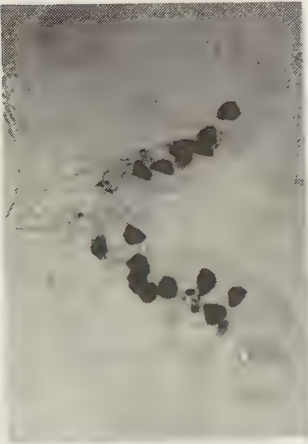


Abb.68. Fremdgewebe in den Speicheldrüsen; Linie Sa₁, Unterlinie N₂, 39./40. Passage.

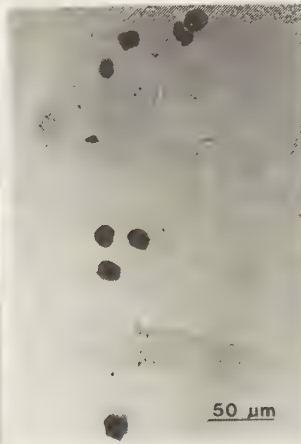


Abb.69. Fremdgewebe in den Speicheldrüsen; Linie Sa₁, Unterlinie N₂, 39./40. Passage.



Abb.70. Chitinöse Struktur frei im Abdomen; Linie Sa₁, Unterlinie N₂, 39./40. Passage.



Abb.71. Fremdgewebe im Mitteldarm (Pfeil); Linie Hi₁, 40. - 42. Passage.

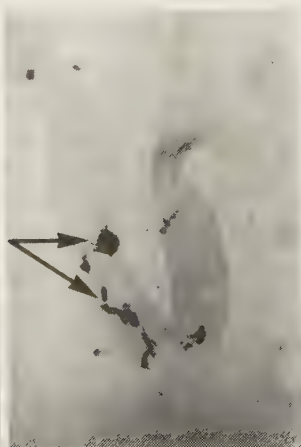


Abb.72. Fremdgewebe im Mitteldarm (Pfeile); Linie Hi₁, 40. - 42. Passage.

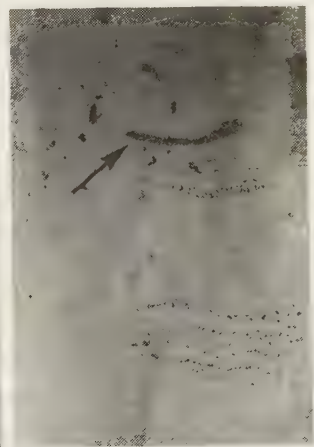


Abb.73. Fremdgewebe in der larvalen Kutikula (Pfeil); Linie Hi₁, 40. - 42. Passage.

band- oder ringförmig über einen gewissen Bereich des Mitteldarms erstreckte, das (nekrotisierte?) Gewebe färbte sich im Aldehyd-Oxidase-Test nicht an. Von ähnlicher schwarz-brauner Farbe waren einzelne Zellen in den Speicheldrüsen zweier weiterer Larven. Die Zellen waren im Enzymtest ebenfalls nicht anfärbbar (Abb. 68, 69). Für eine dieser Larven war beobachtet worden, daß sich in der ersten Hälfte des 3. Larvenstadiums im Inneren der Larve mehrere dunkle Punkte im dorso-lateralen Bereich des 10. Segmentes befanden; anderntags wurden solche dunklen Strukturen nicht mehr im posterioren Bereich, sondern ventral-anterior beobachtet, in einer Position, die den Speicheldrüsen entsprach - wo sie nach dem Öffnen der Larve am dritten Tag auch gefunden wurden (Abb. 69). 4 Larven zeigten bräunliches band- oder punktförmiges Gewebe in der Kutikula der 8. - 11. Segmente (Abb. 73), und bei 4 Larven und 4 adulten Tieren wurden im Abdomen kleine Chitinvesikel gefunden, die nicht an Gewebe gebunden waren und sich auch nicht identifizieren ließen (Abb. 70).

Nach Transplantation von Zellen der zweiten Unterlinie N_4 der Zell-Linie Sa_1 , in der 39. Passage, wurde nur bei 5 Empfänger-tieren (6.3 %) Fremdgewebe beobachtet. Bei einer Larve fand sich solches im Mitteldarm (bräunlich, ringförmig) und bei einer weiteren frei im Abdomen (dunkle punktförmige Struktur). Zwei der adulten "Mosaiktierchen" zeigten vergleichbare freie Strukturen im posterioren Abdomen und eine Fliege hatte an der Grenze 5./6. Tergit einen Streifen bräunlichen (nekrotisierten?) Gewebes, wie es ähnlich für die Kutikula einiger Larven beschrieben wurde.

Zellen der Zell-Linie $z\ spl_1$, die einer späteren als der 11./12., nämlich der 37. Passage, entstammten, wurden nur in relativ wenige (33) Präblastoderm-Empfängereier transplantiert; keiner dieser Empfänger entwickelte sich bis zum 3. Larvenstadium und bei keiner der 1. und 2. Larven konnte Fremdgewebe beobachtet werden.

15 der Tiere (6.9 %), denen im Präblastoderm Zellen der Zell-Linie Hi_1 (40. - 42. Passage) implantiert wurden, zeigten in späteren Entwicklungsstadien Fremdgewebe, davon 14 im Larven- und eines im Adultstadium. 5 Larven und die eine Fliege wie-

sen bräunliches Gewebe im Mitteldarm auf, das bei den Larven bereits im lebenden Zustand durch die Kutikula hindurch zu erkennen war (Abb. 71, 72). Im Aldehyd-Oxidase-Test zeigten diese Gewebebereiche keine Farbreaktion. Bei 2 weiteren Larven fand sich im Bereich der Dentikelgürtel der 9. - 11. Segmente bandförmig ausgebildetes bräunliches Gewebe (Abb. 73). Die restlichen 7 Larven wiesen im posterioren Abdomen einzelne dunkle Strukturen auf, die, in der Zahl von 1 - 4 schwankend, frei in der Körperhöhle zu schwimmen schienen; Einzelheiten waren wegen der geringen Größe und des nekrotischen Charakters der Strukturen nicht zu erkennen.

Ähnliches galt für die kleinen braun-schwarzen Strukturen, die nach Transplantation von Zellen der Zell-Linie 2/10₁ (33./34. Passage) bei 3 Empfängertieren (2.4 %) im Adultstadium gefunden wurden. Bei Larven dieser Versuchsserie konnte kein - integriertes oder nicht integriertes - Fremdmaterial beobachtet werden.

Transplantation von Zellen aus Kultur in den Hinterpol von $y w f^{36a}$ mal Präblastodermstadien erbrachte nach den hier beschriebenen Ergebnissen keinen Nachweis einer, auf Grund von Zellmarkern erkennbaren, echten Integration solcher Spenderzellen im Empfängergewebe; das Alter der Zell-Linien zum Zeitpunkt der Transplantation spielte dabei offensichtlich keine Rolle. Im Gegensatz dazu war nach Transplantation von Blastodermzellen in Präblastoderm- und Blastodermstadien Integration von Spenderzellen gefunden worden. Eine "unechte" Integration von fremdem, evtl. nekrotisiertem Material wurde jedoch bei einigen der Empfänger von Zellen aus Zellkultur beobachtet, was zumindest als Beweis dafür gelten mag, daß die Spenderzellen ins Innere des Embryo gelangt waren. Sämtlichen der frei im larvalen oder adulten Abdomen vorgefundenen Strukturen fehlten erkennbare Chitinmarker, dies stand im Gegensatz zu den nach Transplantation von Blastodermzellen beobachteten Implantaten, von denen zumindest einige Haare oder Borsten erkennen ließen.

4. Diskussion

Drosophila melanogaster ist, was die Genetik und die Entwicklung dieses Organismus betrifft, eines der am besten erforschten höheren Lebewesen. Aus diesem Grunde ist *Drosophila* besonders gut geeignet, grundlegende Fragen der Entwicklungsbiologie, wie die der Differenzierung von Zellen und deren Determination, zu beantworten. Die Entwicklungspotenz von Zellen und Kernen früher Entwicklungsstadien kann mit Hilfe von Zell- und Kerntransplantation am Ei untersucht werden, um dadurch Kenntnis über die Stabilität der Determination von Blastodermzellen sowie über die Potenz von Präblastodermkernen zu erhalten. Dazu werden Zellen und Kerne in verschiedene Regionen von genetisch markierten Empfängerembryonen des gleichen oder anderer Entwicklungsstadien transplantiert. Die Spenderzellen und -kerne sollten sich im Empfängergewebe integrieren, wenn die Determination nicht stabil ist, oder wenn sie in eine ihrer Herkunft entsprechende Eiregion (homotope Transplantation) implantiert werden; sie sollten sich herkunftsgemäß differenzieren und sich nicht im Empfängergewebe integrieren, wenn sie stabil determiniert sind und in Eiregionen implantiert werden, die nicht der Herkunftsregion entsprechen (heterotope Transplantation).

Darüber hinaus ist es von Interesse, zu untersuchen, ob Zellen aus Zellkultur, die sich *in vitro* wie embryonale Zellen verhalten (rege Teilungsaktivität, keine erkennbare Differenzierung), tatsächlich die Potenz besitzen, sich nach Transplantation in ein Ei zu differenzieren. Es ist bekannt, daß sich Zellen, die längere Zeit in Kultur gehalten werden, sowohl morphologisch, als auch in ihren Chromosomen und in ihrem Wachstum verändern. Um solche Veränderungen kontinuierlich verfolgen und gegebenenfalls in Beziehung setzen zu können zu den Transplantationsergebnissen, wurden eigene Zell-Linien von *Drosophila melanogaster* angelegt und über einen Zeitraum von zwei bis drei Jahren auf die oben genannten Merkmale hin untersucht.

Zellkulturen

Abhängigkeit des Wachstums der Zell-Linien vom Alter der Embryonen

Aus Embryonen vier verschiedener Drosophila-Stämme wurden zehn stabile Zell-Linien gewonnen (Abschnitt 3.1.2). Obwohl alle Zellkulturen, aus denen sich die Linien entwickelten, nach derselben Methode aus Embryonen gewonnen und unter den gleichen Kulturbedingungen gehalten wurden, zeigten sie Unterschiede in ihrer Morphologie und in ihren Chromosomen- und Wachstumsverhältnissen. Das Ausgangsmaterial war nicht völlig gleichartig, da in den einzelnen Ansätzen zum Teil unterschiedlich alte Embryonen verwendet wurden (siehe Tabelle 1).

Die Proliferation der etablierten Linien war abhängig vom Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Homogenisation. Bestand das Ausgangsmaterial für die Kulturen aus 6 - 15 h alten Embryonen, so wurde für die etablierten Linien ein langsames Wachstum beobachtet, erkennbar zum einen an der geringeren Anzahl der erforderlichen Passagen pro Monat (Tabelle 1) und zum anderen an einer längeren Verdoppelungszeit, die sich aus den Wachstumskurven ergab (Abb. 26-28, Tabelle 3). Ein Teil der 6 - 15 h alten Embryonen befand sich sicherlich noch im Stadium der Morphogenese, was bedeutet, daß die Keimblätter angelegt und die Keimstreifverlängerung erfolgt waren, doch die Körpergrundgestalt sich noch nicht gebildet hatte. Insbesondere waren Keimstreifverkürzung und Rückenschluß, verbunden mit der endgültigen Ausbildung der Körpersegmente, noch nicht abgeschlossen. Der Anteil solcher jüngerer Embryonen an dem für einen Ansatz verwendeten Material konnte bei der hier nötigen Massengewinnung von Eiern nicht festgestellt werden, mit Ausnahme der Zell-Linie 2/10₄, die ausschließlich aus 5 - 7 h alten Embryonen gewonnen wurde. Diese Linie zeigte als etablierte Linie das langsamste Wachstum, und sie brauchte am längsten, um sich einmal zu verdoppeln. Wurden die Zellkulturen hingegen aus 10 - 18 h alten Embryonen gewonnen, so wuchsen die Zellen rascher. Bei diesen Embryonen war die Körpergrundgestalt bereits angelegt und sie befanden sich im allgemeinen im Entwicklungsstadium der Organogenese, in deren Verlauf die larvalen Organe ausdifferenziert werden.

Eine Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen im Stadium der etablierten Zell-Linien vom Alter der als Ausgangsmaterial dienenden Embryonen ist damit augenfällig. Zellpopulationen der stabilen Linien wuchsen um so rascher, je älter die Embryonen waren, die die Primärkulturen lieferten, und das Zellwachstum war um so langsamer, je jünger die Embryonen waren, die verwendet wurden.

In den ersten 6-10 h der Embryonalentwicklung von *Drosophila* laufen die Mitosen besonders schnell ab. Es wäre zu vermuten gewesen, daß ein hoher Mitoseindex in vivo die Zellproliferation in vitro günstig beeinflusst. Demzufolge hätten junge Embryonen das beste Ausgangsmaterial für stabile Zell-Linien darstellen sollen. Die vorliegenden Daten widersprechen dieser Annahme zumindest hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit. Die Ursache für das raschere Wachstum der von älteren Embryonen abstammenden Zell-Linien könnte in der größeren Anzahl von (imaginalen?) Zellen pro Embryo und/oder der fortgeschrittenen Abgrenzung besonders der imaginalen Zelltypen in späteren Entwicklungsstadien zu suchen sein.

Schneider (1972) gewann stabile *Drosophila* Zell-Linien aus Zellvesikeln, die sich 2-3 Wochen nach Ansatz aus den Schnittkanten von 20-24 h alten halbierten Embryonen bildeten. Diese kontinuierlich nachwachsenden Zellvesikel bestanden zumindest teilweise aus imaginalen Zellen, wie Transplantationstests in III. Larven zeigten: Die Implantate wiesen nach der Metamorphose adulte Chitinstrukturen auf. Auf Grund dieser Transplantationsstudien zog Schneider den Schluß, daß sich mindestens eine Zell-Linie aus imaginalen Zellen entwickelt haben mußte und ferner, daß halbierte ältere Embryonen ebenso als Ausgangsmaterial für stabile Zell-Linien dienen konnten wie 6-12 h alte homogenisierte Embryonen, die für die Ansätze der ersten stabilen Zellkulturen von *Drosophila melanogaster* verwendet wurden (Kakpakov et al., 1969; Echalié und Ohanessian, 1970).

Die seither von verschiedenen Experimentatoren angelegten *Drosophila* Zell-Linien wurden aus Embryonen sehr unterschiedlicher Entwicklungsstadien gewonnen: Mosna und Dolfini (1972) verwendeten homogenisierte 12-15 h alte Embryonen; Richard-Molard (1975)

gewann aus homogenisierten 6-12 h alten Embryonen stabile Zell-Linien und die von Bernhard et al. (1980) angelegten stabilen Zell-Linien stammten von gemischten Populationen 4-20 h alter homogenisierter Embryonen ab. Ein Zusammenhang zwischen den Wachstumsverhältnissen der etablierten Linien und der Entwicklungsstufe des embryonalen Ausgangsmaterials ließ sich für die Zell-Linien dieser Autoren nicht erkennen. Es wurde allerdings auch in keinem dieser Fälle von Parallelkulturen berichtet, die, aus unterschiedlich alten Embryonen gewonnen, unter den gleichen Kulturbedingungen gehalten worden wären.

Zellmorphologie und Wachstum der Zell-Linien

Die Primärkulturen der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Zell-Linien ließen in Entwicklung und Aussehen kaum Unterschiede erkennen, die auf ein beschleunigtes oder verlangsamtes Wachstum in späteren Kulturstadien hingedeutet hätten. Bemerkenswert ist allerdings, daß in den degenerierenden Primärkulturen der später besonders schnell wachsenden Zell-Linien Hi_1 und Hi_3 der multiplikative Zelltyp der runden Zellen überwog und Fibroblasten-ähnliche Zellen kaum zu beobachten waren. Bei allen anderen Linien hingegen zeigten sich in der degenerierenden Primärkultur als erstes größere Gruppen von Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die zunächst stark proliferierten und erst später durch Gruppen von Epithelzellen und runden Zellen ergänzt bzw. verdrängt wurden.

Im Gegensatz zu den Primärkulturen zeigten die Zellen der etablierten Linien durchaus Unterschiede in der Morphologie (siehe Abschnitt 3.1.2.1, Abb. 6-16). Überwiegend runde bis polygonale Zellen wurden in den Kulturen der Linien Sa_1 , Sa_2 , $z\ spl_1$, Hi_1 , Hi_2 , $2/10_2$ und $2/10_3$ beobachtet; die Linien $2/10_1$ und $2/10_4$ wiesen neben runden und polygonalen Zellen besonders viele Fibroblasten-ähnliche Zellen auf; in den Kulturen der Linie $2/10_3$ waren ebenfalls länglich spindelförmige Zellen mit Fortsätzen, d.h. Fibroblasten-ähnliche Zellen, zu finden. Diese drei zuletzt genannten Zell-Linien wuchsen am langsamsten. Von den schnell wachsenden Zell-Linien (Sa_1 , Sa_2 , $z\ spl_1$, Hi_1 und Hi_3) hatten, mit Ausnahme der Linie Hi_3 , alle runde bis polygonale Zellen, die meist einen gleichmäßigen dichten Zellrasen bildeten (Abb. 6-9).

Von den beiden Unterlinien N_2 und N_4 der Linie Sa_1 wuchs die Unterlinie N_2 deutlich rascher, sie zeigte fast ausschließlich runde Zellen einheitlicher Größe, während die Unterlinie N_4 auch Fibroblasten-ähnliche Zellen aufwies. Im Gegensatz dazu bestand die Linie Hi_3 aus länglich epithelialen Zellen, die auf dünnerem Zellrasen einzelne große Haufenkolonien bildeten (Abb. 11). Die Linien Hi_2 und $2/10_2$, die eine durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit zeigten, bestanden aus runden Zellen, die schlecht auf der Unterlage hafteten und nur einen dünnen ungleichmäßigen Zellrasen bildeten.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß Zellen von runder bis polygonaler Form im allgemeinen rascher wachsen und sich auch häufiger teilen, als Fibroblasten-ähnliche Zellen. Hafteten runde Zellen jedoch nicht gut auf der Unterlage, dann waren sie offensichtlich in ihrer Wachstums- und Teilungsaktivität beeinträchtigt. Folkman und Moscona (1978) fanden für nicht-transformierte Mammalierzellen eine Korrelation zwischen Zellform und Zellwachstum der Art, daß Zellen von kugeliger Form mit kleinem Durchmesser eine geringe, flach ausgebreitete Zellen von Fibroblasten-ähnlicher Form jedoch die höchste DNA-Synthese-Aktivität aufwiesen. Bei den hier beschriebenen *Drosophila* Zell-Linien ist der Zusammenhang zwischen Zellform und Zellwachstum gerade umgekehrt. Nicht-transformierte Mammalierzellen unterscheiden sich allerdings auch in anderer Hinsicht von den Zellen etablierter *Drosophila* Zell-Linien: Die von Folkman und Moscona getesteten drei Zell-Linien aus Endothelzellen der Rinder-Aorta zeigten auf Plastikunterlage in Zellkulturflaschen oder -petrischalen nach der Passage ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen. Mit zunehmender Zelldichte verkleinerte sich der Zelldurchmesser, und die Zellhöhe nahm zu. Die Zellen zeigten bei Erreichen der Konfluenz eine sogenannte Kontakthemmung, d.h., sie hörten auf, sich zu teilen, so daß keine mehrschichtigen Zellkolonien entstanden. Die Zellen wuchsen auch nicht in Suspension.

Das Phänomen der Kontakthemmung war bei den *Drosophila* Zell-Linien nicht zu beobachten: Fast alle Linien formten Kolonien aus mehreren Zell-Lagen, und bei den älteren Kulturen, insbesondere der schnell wachsenden Linien, befanden sich regelmäßig viele Zellen in Suspension.

Bei transformierten Mammalierzellen, die hinsichtlich ihres "ungehemmten" Wachstums Krebszellen ähneln, ist eine Kontakthemmung ebenfalls nicht zu beobachten, und unabhängig von der Zellform werden ihr Wachstum und ihre Replikation von der Art der Unterlage nicht beeinflusst. Die etablierten Drosophila Zell-Linien zeigten demnach in ihrem Wachstumsverhalten mehr Ähnlichkeit mit transformierten als mit nicht-transformierten (primären?) Zell-Linien von Mammaliern.

Karyotypen der Zell-Linien

Ein Merkmal, das die Zellform und das Zellwachstum sehr wahrscheinlich beeinflusst, ist der Karyotyp der Zellen. Die in Tabelle 2 zusammengefaßten Daten über die bei den einzelnen Zell-Linien beobachteten Karyotypen mit unterschiedlicher Kombination von Geschlechtschromosomen lassen allerdings keine eindeutigen Korrelationen zu Zellwachstum und/oder Zellform erkennen. Sowohl schnell, als auch langsam wachsende Linien besaßen eine Mischung der drei verschiedenen Karyotypen XX, XY und XO. Art und Anzahl der Geschlechtschromosomen scheinen damit für ein beschleunigtes oder verlangsamtes Zellwachstum nicht von Bedeutung zu sein. Eher ließe sich ein Zusammenhang erkennen zwischen dem Ploidiegrad und dem Wachstum der Zellen. Schnell wachsende Zell-Linien hatten zumeist einen geringeren Anteil an diploiden Zellen und einen erhöhten Anteil an tetraploiden Zellen. Dies galt vornehmlich für die Linie Hi_1 (ca. 40% tetraploide Zellen) und die Unterlinie N_2 (26-56% tetraploide Zellen) der Linie Sa_1 , die rascher wuchs als die Unterlinie N_4 der gleichen Linie. Die besonders langsam wachsenden Linien $2/10_1$, $2/10_3$ und $2/10_4$ hatten einen hohen Diploidiegrad von 90 und mehr Prozent; eine Ausnahme bildete die Linie $2/10_3$ in der 10. Passage.

Tetraploide Zellen benötigen demnach für einen Zellzyklus nicht mehr Zeit als diploide Zellen, obwohl sie während der S-Phase die doppelte Menge an DNA synthetisieren müssen. Ein Zusammenhang zwischen Ploidiegrad und Zellwachstum läßt sich allerdings mit den hier gewonnenen Daten nicht eindeutig belegen, da zwar annähernd rein diploide, aber keine rein tetraploiden Zell-Linien gewonnen wurden. Die Ploidieverhältnisse variierten zudem im Verlauf der Evolution der Zell-Linien.

In einem Zeitraum von 2 Jahren wurden zum Teil sehr deutliche Veränderungen der diploiden Karyotypen beobachtet. Aus einem ursprünglichen Homogenat von embryonalen Zellen, bei denen weibliche und männliche diploide Zellen in etwa gleichen Anteilen vorhanden waren, entwickelten sich eine rein weibliche (z spl₁, Unterlinie N₅F) und eine rein männliche Linie (2/10₂). Die übrigen Zell-Linien bzw. Unterlinien enthielten zumeist ein Gemisch aus weiblichen XX, männlichen XY und XO Zellen, wobei der Anteil der einzelnen Karyotypen im Verlauf der Evolution der Linien stark wechselte.

Die Linie Sa₁ schien sich zunehmend in eine XY Zell-Linie zu entwickeln, bei abnehmenden Anteilen der XX Zellen und niedrigen Anteilen von XO Zellen; für die Unterlinie N₄ war dieser Prozeß weniger stark ausgeprägt als für die Unterlinie N₂. Bei der Linie Sa₂ hingegen stieg der Anteil von XO Zellen ständig bei Abnahme sowohl der Anteile der XX als auch der XY Zellen. Diese Zell-Linie zeigte neben einem Geschlechtschromosomen-Verlust (XX→XO und/oder XY→XO) auch in vielen Zellen den Verlust eines vierten Chromosoms. Ein solcher haplo-IV Karyotyp wurde für verschiedene andere Drosophila Zell-Linien beschrieben: Linie K_C von Echalié und Ohanessian (Dolfini, 1971), Linien GM₁ und GM₃ von Mosna (Mosna und Dolfini, 1972; Faccio Dolfini, 1974), Linie Ca von Echalié und Ohanessian (Halfer, 1978).

Ein haplo-IV Chromosomensatz scheint, im Gegensatz zum haplo-II oder haplo-III Chromosomensatz, von Zellen in Kultur toleriert zu werden. Das ist bei der im Verhältnis zu den anderen Autosomen sehr geringen Größe des vierten Chromosoms verständlich. Die IV. Chromosomen bestehen nach Untersuchungen von Hochman (1976) und Barigozzi et al. (1977) überwiegend aus Heterochromatin und nur zu einem kleinen Teil aus Euchromatin. Dieser kleine euchromatische Bereich im rechten Chromosomenarm trägt, verglichen mit den II. und III. Autosomen, relativ wenige Gene (ca. 60-75 Gene nach Hochman, 1973), auf deren zweifaches Vorhandensein Zellen in Kultur verzichten können, ohne in ihrem Wachstum entscheidend behindert zu sein. Auch in vivo wird die haplo-IV Situation toleriert; haplo-IV Fliegen sind lebensfähig, wenn sie auch meist reduzierte Vitalität und/oder Anomalien (z.B. Minute Phänotyp) zeigen (Hochman, 1976).

Die Zell-Linie $z\ spl_1$ entstand aus dem Drosophila-Stamm $C(1)RM, y\ v; Dp(1;f)z^9, z/ \overline{XY}, Df(1)sc^{J4R}, sc\ cv; Dp(1;f)z^9, z$ der eine freie Duplikation ($Dp(1;f)z^9$) für das distale Ende des X Chromosoms trägt. Die Weibchen besitzen compound-X Chromosomen, die Männchen tragen compound- $\overline{XY}$ Chromosomen, wobei dem X Chromosom das distale Ende fehlt (Defizienz $Df(1)sc^{J4R}$). Diese Defizienz ist durch die freie Duplikation $Dp(1;f)z^9$ kompensiert. Die Zellen des weiblichen Karyotyps compound-X + Duplikation waren überwiegend oder ausschließlich vorhanden. Ein Auseinanderbrechen der compound-X oder compound- $\overline{XY}$ Chromosomen wurde nicht beobachtet. Es fanden sich weder getrennte X oder Y Chromosomen noch ein XO Karyotyp. Die freie Duplikation war in allen untersuchten Metaphasen vorhanden. In einem Teil der weiblichen Zellen der Unterlinie C_1 war ab der 20. Passage (Zell-Linie etabliert seit ca. 15 Monaten) ein weiteres stark anfärbbares Chromatinfragment zu erkennen, das die gleiche Größe wie die freie Duplikation besaß (Abb. 24). Die IV. Chromosomen ließen sich in diesen Zellen nicht als separate Einheiten anfärben. Das läßt eine Zusammenlagerung von einem oder beiden IV. Chromosomen mit einem anderen Chromosomenfragment vermuten, möglicherweise mit einem Fragment der freien X chromosomal Duplikation. Eine solche Translokation zwischen IV. Chromosomen und X chromosomalem Material ist nicht unwahrscheinlich, da das IV. Chromosom möglicherweise zum Teil vom X Chromosom abstammt und als sogenanntes ex-X bezeichnet wird (Hochman, 1976). Faccio Dolfini (1974) beschrieb Zelltypen der Linie GM_3 (XY, haplo-IV), bei denen zum einen eine Translokation zwischen dem IV. Chromosom und dem Heterochromatin des X Chromosoms, sowie im anderen Fall eine Translokation zwischen dem IV. Chromosom und einem der II. Chromosomen zu beobachten war. Halfer (1978) fand in Zellen der Linie Ca , Unterlinie Ca_3 (XY, haplo-IV) fragmentierte Y Chromosomen oder auch ein ungewöhnlich langes Y Chromosom bei gleichzeitigem Verlust des freien IV. Chromosoms. Translokationen der IV. Chromosomen an (bevorzugt) Heterochromatin der Geschlechtschromosomen scheinen demnach bei Drosophila-Zellen, die längere Zeit in Kultur gehalten wurden, nicht selten zu sein.

Veränderungen im Karyotyp waren auch bei der Zell-Linie Hi_1 zu verfolgen. Eines der beiden X Chromosomen in den weiblichen

Zellen bestand nur aus dem heterochromatischen Teil und einem kleinen Stück Euchromatin. Dieses fragmentierte X Chromosom, das in der 3. Passage in allen auswertbaren Metaphase-Zellen vorhanden war, war in der 32. Passage nur noch in einem geringen Anteil der Zellen nachzuweisen (16% XX Zellen). Der Großteil der Zellen (84%) zeigte zu diesem Zeitpunkt den XO Karyotyp. Der Verlust des fragmentierten X Chromosoms beeinträchtigte die Zellen der Linie Hi_1 in ihrem Wachstum offenbar nicht. Diese Linie wuchs sogar besonders rasch.

Eine ähnliche Verschiebung des Anteils von XX Zellen und die Zunahme des Anteils von XO Zellen war bei der schnell wachsenden Zell-Linie Hi_3 , Unterlinie N_7 zu beobachten. Die Zellprobe aus dem Überstand N_2 , also noch vor der ersten Passage, bestand zu über 90% aus normalen XX Zellen, die restlichen Zellen waren XY Zellen oder XO Zellen. In der 10. Passage waren die XY Zellen völlig verschwunden, gleichzeitig war der Anteil der XO Zellen dramatisch gestiegen (88%), die Chromosomenpräparate der 26. Passage zeigten dann nur mehr XO Zellen. Das X Chromosom der XO Zellen aus der 10. und 26. Passage war länger als normal, es trug am heterochromatischen Ende ein zusätzliches Stück Heterochromatin (Abb. 22). Die Unterlinie N_8 hingegen, die nur einmal in der 27. Passage untersucht wurde, schien den ursprünglichen Karyotyp weitgehend beibehalten zu haben (93% XX Zellen), ein Befund, der zeigt, daß sich Unterlinien bezüglich ihrer Karyotypen (und auch hinsichtlich ihrer Morphologie) sehr unterschiedlich entwickeln können, dies bei gleichem Ausgangsmaterial und unter gleichen Kulturbedingungen (vergl. auch die untersuchten Unterlinien der Zell-Linien Sa_1 und $z\ spl_1$). Zellen mit veränderten X Chromosomen wurden auch bei der Zell-Linie $2/10_3$ beobachtet. In Präparaten aus der 10. Passage fand sich bei ca. $2/3$ der XX Zellen ein X Chromosom, das neben dem Heterochromatinteil nur ein reduziertes Stück Euchromatin zu besitzen schien (Abb. 23). In Präparaten aus der 23. Passage enthielten alle XX Zellen dieses reduzierte X Chromosom.

Veränderungen im X Chromosom, sichtbar als Verlust oder Zuwachs an Chromatin, waren demnach bei Zellen der etablierten Zell-Linien relativ häufig zu beobachten. Einige Zell-Linien

entwickelten sich daneben zu einem fast reinen XO Karyotyp. Daraus läßt sich schließen, daß *Drosophila*-Zellen in vitro den partiellen oder totalen Verlust eines der beiden X Chromosomen - oder auch des Y Chromosoms - verhältnismäßig leicht tolerieren. In vivo führt die XO Situation ja ebenfalls zu lebensfähigen, wenngleich sterilen, männlichen Individuen. Aneuploidien der großen Autosomen (II. und III. Chromosomenpaar) scheinen hingegen von Zellen in vitro nicht oder nur in begrenztem Umfang toleriert zu werden, zumindest wurden in diploiden Zellen keine numerischen oder sonstigen Veränderungen dieser großen Autosomen gefunden. Ähnliches beobachteten auch Mosna und Dolfini (1972) und Faccio Dolfini (1974) für die Zell-Linien GM₁, GM₂ und GM₃.

Wie weit die XO Situation Zell-Linien in ihrem Wachstum beeinflusst, läßt sich an Hand der vorliegenden Daten nicht eindeutig feststellen; eine Beeinträchtigung des Zellwachstums ist jedoch unwahrscheinlich, da alle Linien mit hohen Anteilen an XO Zellen zu den schnell wachsenden Zell-Linien zählten. In der Literatur sind hierzu Angaben nicht zu finden, da bisher nur wenige *Drosophila* Zell-Linien beschrieben wurden, die überwiegend einen XO Karyotyp aufwiesen (Halfer, 1978; Bernhard et al., 1980) und ausführliche Daten über das Wachstumsverhalten dieser XO Linien nicht publiziert wurden.

Zell- und Kerntransplantationen am Ei

Transplantation von Präblastodermkernen

Bevor die Entwicklungspotenz von Blastodermzellen und von Zellen aus Kultur im Transplantationsexperiment untersucht wurde, war es sinnvoll, zur Kontrolle Präblastodermkerne in *Drosophila*-Eier dreier verschiedener Entwicklungsstadien zu transplantieren. Kerne aus frühen Entwicklungsstadien des *Drosophila*-Eies sind totipotent, wenn sie in unbefruchtete Eier transplantiert werden (Illmensee 1972, 1973). Werden solche Kerne in Furchungsstadien befruchteter Eier transplantiert, dann nehmen sie an der Entwicklung des Empfängergewebes teil. Präblastodermkerne aus dem vorderen bzw. hinteren Polbereich oder aus anderen Eiregionen werden nach Transplantation in verschiedene Eiregionen im Empfängergewebe integriert (Zalokar 1971, 1973; Illmensee 1976; Okada et al. 1974, 1980; Santamaria 1975, 1983).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kerntransplantationen an sehr frühen Entwicklungsstadien bestätigen dies. Dienten Eier im Furchungsstadium als Empfänger, so wurden mwh e Spenderkerne in den y w f^{36a} mal Empfänger integriert. Kerne aus dem Vorderpol lieferten nach Transplantation in den Hinterpol Mosaikbereiche in ausschließlich abdominalen Organen (Tabelle 17). Bei einigen Mosaiktieren fanden sich in der Nachkommenschaft Abkömmlinge der Spenderkerne. Das bedeutet, daß die anterioren Spenderkerne auch in Keimbahnzellen integriert wurden.

Die Transplantation von Präblastodermkernen in Eier der fortgeschrittenen Stadien des Präblastoderms und des zellulären Blastoderms erbrachte hingegen keinen Beweis für die Totipotenzen dieser Kerne: Empfängertiere mit in y w f^{36a} mal Gewebe integrierten mwh e Spenderkernen wurden nicht gefunden (Tabellen 5 und 6). Eine autonome Entwicklung des Spendermaterials entsprechend der Herkunftsregion, etwa als freies Implantat, wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Präblastodermkerne scheinen nach diesen Ergebnissen die Potenz, unabhängig von ihrer Herkunft an der Entwicklung der verschiedenen Organe teilzunehmen, nur in geeigneter Umgebung manifestieren zu können. Eine solche geeignete Umgebung ist offenbar das befruchtete Ei im Furchungsstadium. Nach den hier vorliegenden Daten können Eier im Präblastoderm- und Blastodermstadium Spenderkerne aus dem Präblastoderm nicht oder nur in verringertem Umfange integrieren. Die Anzahl der Tiere in diesen beiden Transplantationsserien war verhältnismäßig gering, deshalb läßt sich nicht sagen, ob die Integration von Spenderkernen in Eiern dieser Entwicklungsstadien gänzlich ausgeschlossen ist oder ob sie nur seltener stattfindet als bei Furchungsstadien. Falls bei Transplantationen von Präblastodermkernen in Eier des Präblastoderms und des Blastoderms Mosaikgewebe auftritt, dann dürfte dies nur sehr selten geschehen und zwar mit einer Häufigkeit von unter 1%.

Kauffman (1980) transplantierte größere Gruppen von Präblastodermkernen (10-60) mit dazugehörigem Cytoplasma in heterotope Regionen von Eiern im Präblastodermstadium. Nach Kultur der halbierten Empfängerembryonen in adulten Zwischenwirten und Metamorphose in Wirtsabdomen wurde bei 20% der zu Adultstrukturen differenzierten Implantate Spendergewebe gefunden. Bezogen auf die Anzahl der adulten Tiere, denen halbierte Empfängerembryonen injiziert wurden, entsprach dies einem Anteil von 0.4%. Simcox und Sang (1983) beobachteten nach Transplantation von etwa 10 Kernen aus dem Präblastoderm in Eier des Präblastodermstadiums bei einigen Empfängern im Adultstadium Mosaikgewebe. Die Mosaikrate lag, bezogen auf die Anzahl der injizierten Embryonen, bei 0.8%. Demnach ist es Präblastodermkernen möglich, in Präblastodermempfängern Mosaikgewebe zu bilden, wenn auch mit geringer Häufigkeit. Voraussetzung dafür mag sein, daß die Kerne in größerer Anzahl (mindestens 10) und mit größeren Mengen umgebendem Cytoplasma transplantiert werden. Der Innendurchmesser der von Simcox und Sang verwendeten Glaskanülen betrug 25-30 μm und war damit doppelt so groß wie der der in der vorliegenden Arbeit benutzten Kanülen.

In den Experimenten von Kauffman differenzierte sich das von den Spenderkernen abstammende Gewebe autonom gemäß der Her-

kunftsregion. Das deutet darauf hin, daß Präblastodermkerne bereits vor der Zellbildung determiniert sind, anteriore oder posteriore Strukturen zu bilden. Andererseits zeigten einige Implantate mit Empfänger-Genotyp Adultstrukturen, die der Herkunftregion der Spenderkerne entsprachen. Dies wurde von Kauffman dahingehend interpretiert, daß Cytoplasma aus Präblastodermstadien Kerne gleich alter Empfänger neu determinieren könne. Zum Zeitpunkt kurz vor der Zellwandbildung wären demnach (einzelne?) Kerne bereits determiniert, andererseits aber könnte transplantiertes Cytoplasma auch eine Änderung dieses determinierten Status bewirken.

Die Beobachtung, daß Kerne aus Präblastoderm- und sogar aus Gastrulationsstadien (Illmensee 1973) nach Transplantation in unbefruchtete Eier im Furchungsstadium Totipotenz zeigen, müßte diesem von Kauffman postulierten determinierten Zustand der Präblastodermkerne nicht notwendigerweise widersprechen. Es könnte sein, daß eine bis zum späten Präblastoderm erfolgte instabile Determination der Kerne nur nach Transplantation in gleich alte Empfänger aufrecht erhalten bleibt, nicht aber nach Transplantation in frühe Entwicklungsstadien. Unter den Bedingungen der frühen Furchung mit einer hohen DNA-Synthese- und Kernteilungsrate könnte nun eine Deprogrammierung der Spenderkerne erfolgen, die zur Totipotenz führt. Um die Frage, ob Präblastodermkerne totipotent oder determiniert sind, zu klären, wäre es sicher von Nutzen, weitere Transplantationen solcher Kerne in verschiedene Regionen von Eiern verschieden alter Furchungs- und Präblastodermstadien durchzuführen.

Präblastodermkerne transplantiert in den Hinterpol oder in den Vorderpol des zellulären Blastoderms lieferten in keinem der Empfängertiere nachweisbares Mosaikgewebe. Spenderkerne, ob nun für eine bestimmte Entwicklungsrichtung programmiert oder nicht, wurden in der zellulären Umgebung des Blastoderms weder integriert noch differenzierten sie sich. Das Fehlen von Mosaiktieren in dieser Versuchsserie wird noch deutlicher bei einem Vergleich dieser homotopen Kern → Blastoderm Transplantationen mit den homotopen Zell → Blastoderm Transplantationen, die im folgenden diskutiert werden. Versuchsserien,

in denen Blastodermzellen in homotope Regionen des Hinterpols und des Vorderpols von Eiern im Blastodermstadium transplantiert wurden, ergaben Mosaikraten von 31.3% bzw. 17.1%. Selbst bei der kleineren Anzahl von Versuchstieren in den Kern → Blastoderm Transplantationen (Tabelle 6) hätten bei Mosaikraten dieser Größenordnung Mosaiktiere auftreten müssen.

Transplantation von Blastodermzellen

Mit den Experimenten sollte geklärt werden, ob Blastodermzellen stabil determiniert sind oder ob sie sich nach Transplantation in heterotope Empfängerregionen auch nicht-herkunftsgemäß entwickeln können. Hinsichtlich des Schicksals der transplantierten Zellen bestehen im wesentlichen folgende Möglichkeiten:

- I Alle Blastodermzellen einer Region sind nicht-stabil determiniert.
 - 1) Homotope Transplantation (Kontrolle) → Integration = Mosaik
 - 2) Heterotope Transplantation → nicht herkunftsgemäße Entwicklung
= Integration (Mosaik)
- II Alle Blastodermzellen einer Region sind stabil determiniert.
 - 1) Homotope Transplantation (Kontrolle) → Integration = Mosaik
 - 2) Heterotope Transplantation → herkunftsgemäße Entwicklung
= keine Integration
- III Mehrzahl der Blastodermzellen einer Region ist stabil determiniert, einige (wenige) sind pluripotent.
 - 1) Homotope Transplantation (Kontrolle) → Integration = Mosaik
 - 2) Heterotope Transplantation → herkunftsgemäße Entwicklung und/oder Integration (Mosaik)

Darüber hinaus sollte auch an die Möglichkeit gedacht werden, daß Organe, die sich über einen größeren Bereich des Keimes erstrecken (Darm, Nervengewebe, Muskulatur), bereits im Blastoderm in verschiedenen Regionen angelegt werden. Wenn Zellen solcher Regionen nach Transplantation in eine andere Region mit gleicher Determination gelangen, dann würde dies einer homotopen Transplantation entsprechen, und es wäre Integration = Mosaik zu erwarten.

Homotope Transplantationen dienten grundsätzlich als Kontrolle, außerdem sollten sie zeigen, welche Eiregionen für die Transplantation am besten geeignet sind, daß heißt, welche die höchsten Überlebensraten ergeben.

Homotope Transplantationen

Hinterpol → Hinterpol (Tabelle 18) und posteriorer Lateralbereich → posteriorer Lateralbereich (Tabelle 21)

Wie zu erwarten war, wurden bei homotoper Transplantation Mosaik besonders häufig beobachtet. So hatte zum Beispiel in der Transplantationsserie Hinterpol → Hinterpol fast ein Drittel aller Tiere Spendergewebe gezeigt, etwa 90% der Mosaiktiere hatten die Spenderzellen im Wirtsgewebe integriert. Blastodermzellen aus dem Hinterpolbereich wurden vornehmlich in die hintere Mitteldarmanlage der Empfängerembryonen integriert: Etwa drei Viertel aller Mosaiktiere zeigten Zellen mit Aldehyd-Oxidase-Aktivität im hinteren und mittleren Mitteldarm. Allerdings muß hier wie bei allen noch zu diskutierenden Fällen von Darmmosaik auf darauf hingewiesen werden, daß nicht getestet werden konnte, ob die im Darmgewebe integrierten Spenderzellen auch tatsächlich als Darmzellen funktionierten. Die Zellen wurden nur auf Aldehyd-Oxidase-Aktivität hin untersucht, nicht auf ihre Funktion als Darmzellen.

Vermutlich stammte in den Fällen mit Mitteldarmmosaik mindestens eine der transplantierten Blastodermzellen aus dem Bereich der hinteren Mitteldarmanlage des Spenders. Der Blastodermbereich, der den Polzellen am Hinterpol benachbart liegt, gilt als Region der hinteren Mitteldarmanlage. Nach der Bildung des ventralen Keimstreifs formen die Zellen dieses Bereichs eine Tasche, in der die Polzellen während der weiteren Gastrulationsvorgänge dorsal nach vorne getragen werden (Poulson, 1950; Counce, 1973; Turner und Mahowald, 1977; Fullilove und Jacobson, 1978).

Nicht auszuschließen ist allerdings, daß Polzellen, die bei den Hinterpol → Hinterpol Versuchsserien ebenfalls mittransplantiert wurden, in Mitteldarmgewebe der Empfänger integriert

wurden. Polzellen, die durch transplantiertes Polplasma in der ventralen Eimitte und am Vorderpol induziert wurden, gelangten nach Transplantation in den Hinterpol von Eiern im Blastodermstadium nicht nur in die Keimbahn, sondern ließen sich auch als mal⁺ Zellen im Mitteldarm der Wirtstiere nachweisen (Illmensee, 1976; Illmensee et al., 1976).

Wird durch UV-Bestrahlung des Hinterpols die Bildung von Polzellen verhindert, so sind bestimmte Zellen des larvalen Mitteldarms, die sog. cuprophilen Zellen, nicht oder nur in stark verringerter Anzahl zu finden (Poulson und Waterhouse, 1960). Einige Polzellen mögen bei ihrer späteren Wanderung durch die Mitteldarmanlage zu den Gonaden (ca. 7-8 h nach Eiablage) auch im Mitteldarmepithel "hängen" bleiben und dort integriert werden (Fullilove und Jacobson, 1978).

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Hinterpol → Hinterpol Transplantationen wurden mit Sicherheit auch Polzellen transplantiert, denn für einige Tiere dieser Serie konnten Mosaikgonaden nachgewiesen werden, zum einen durch den histochemischen Nachweis der Aldehyd-Oxidase-Reaktion, zum anderen durch das Auftreten von mwh e Tieren in der Nachkommenschaft. Da das Geschlecht von Spender- und Empfängereiern zum Zeitpunkt der Transplantation nicht feststellbar ist, ergaben sich für 50% der Polzell-Transplantationen heterosexuelle Kombinationen, die zu nicht-funktionsfähigen Keimzellen führen (Van Deusen, 1976). Die Transplantation von Blastodermzellen aus heterotopen Regionen, in denen keine Polzellen gebildet werden, in den Hinterpol, führte in keinem Fall zu einem Keimbahnmosaik (Tabelle 18). Blastodermzellen unterscheiden sich morphologisch von Polzellen durch das Fehlen von den im Polplasma enthaltenen charakteristischen Polgranulen; Blastodermzellen können sich offenbar nicht zu Keimzellen differenzieren, da ihnen die Keimbahnqualität der Polzellen fehlt (Illmensee, 1976).

Marsh und Wieschaus (1977) wiesen nach, daß die Mutation maroon-like zumindest in den weiblichen Keimzellen zellautonom ist, unabhängig vom Genotyp der mesodermalen Komponenten der Ovarien wie Follikelzellen und Ovarienhülle. Follikel-

zellen von mal⁺ Wildtyp-Weibchen zeigen geringe Aldehyd-Oxidase-Aktivität, die in Form eines schwach gefärbten Zellkranzes um die dunkel gefärbten mal⁺ Oocyten erkennbar ist (Marsh und Wieschaus, 1977). Bei Vorhandensein von mal⁺ Follikelzellen in mal Empfängern müßten ungefärbte mal Oocyten einen dunkleren Zellsaum tragen. Das in Abbildung 51 gezeigte Mo-saikovarium scheint neben von Spender-Polzellen abstammenden mal⁺ Oocyten auch eine vom mal Empfänger abstammende reife Oocyte zu besitzen. Deren Chorion ist dunkel gefärbt und wurde möglicherweise von Follikelzellen gebildet, die von mal⁺ Spender-Blastodermzellen abstammten. Der von Janning (1976) aufgestellte Anlagenplan, basierend auf der Analyse larvaler und adulter Gynander, zeigt die Position der Anlagen für die inneren Genitalien in der hinteren Eiregion, anterior und ventral zur hinteren Mitteldarmanlage. Danach ist es möglich, daß bei der Transplantation von Blastodermzellen aus dem Hinterpol Zellen, die aus dem Anlagebereich der inneren Genitalien stammten, beim Empfänger in mesodermales Genitalienmaterial integriert wurden.

Integration im ektodermalen Teil der Genitalien (Analplatten) wurde ebenfalls bei einem Weibchen beobachtet, erkenntlich an den mwh e Borsten in der y w f^{36a} Umgebung. Der Anlagenbereich für die äußeren Genitalien befindet sich im Anlageplan von Janning geringfügig posterior dem der inneren Genitalien. In Tieren aus homotoper Transplantation am Hinterpol ist demnach Integration von Spenderzellen in diesem Bereich der adulten Kutikula durchaus zu erwarten.

Nach homotoper Hinterpol → Hinterpol Transplantation wurden Mosaike auch in den Malpighischen Gefäßen der mal Empfänger beobachtet. Dieser Befund überrascht nicht, wird doch der Anlagebereich der Malpighischen Gefäße, die aus Ausstülpungen an der Grenze von Mitteldarm zum Enddarm gebildet werden (Fullilove und Jacobson, 1978), in der posterioren Lateralregion nahe dem Hinterpol vermutet (Janning, 1976, 1980). mal⁺ Zellen fanden sich auch in den Malpighischen Gefäßen eines Tieres aus der homotopen Transplantationsserie posteriore Lateralregion → posteriore Lateralregion (0.15 Eilänge), wodurch diese Region als Anlagebereich der Malpighischen Gefäße bestä-

tigt wird. Darüber hinaus wurden Defekte der Malpighischen Gefäße gehäuft nach Transplantation in die posteriore Lateralregion beobachtet (Abschnitt 3.2.2; Tabelle 16).

Homotope Transplantation Vorderpol → Vorderpol (Tabelle 19)

Bei der homotopen Transplantation von Vorderpolzellen in den Vorderpol zeigten 17.1% der Tiere Spendergewebe, 90% davon hatten die Spenderzellen integriert. Mosaikgewebe wurde ausschließlich im Darm gefunden und zwar sowohl im vom Ektoderm abstammenden Vorderdarm als auch im endodermalen vorderen Mitteldarm. Der Vorderdarm, zumindest der larvale, ist für die Mosaikanalyse geeignet, da der Proventrikel im Wildtyp Aldehyd-Oxidase-Aktivität zeigt, in der mal Mutante jedoch nicht. Im Gegensatz dazu hat der ebenfalls vom Ektoderm abstammende Enddarm auch im Wildtyp große Bereiche ohne Enzymaktivität; Spenderzellen in diesem Darmabschnitt konnten deshalb bei den homotopen Hinterpol → Hinterpol Transplantationen nicht erfaßt werden.

Die Integration von mal⁺ Zellen im Vorderdarm und vorderen Mitteldarm ist zu erwarten, wenn bei homotoper Vorderpol → Vorderpol Transplantation Blastodermzellen aus der Stomodäusanlage und aus der vorderen Mitteldarmanlage entnommen und beim Empfänger in eben diese Anlagebereiche implantiert wurden. Die Invagination der vorderen Mitteldarmanlage erfolgt ventral im vorderen Eidritzel, anterior zum ventralen Keimstreif, und wiederum anterior dazu wird das Stomodäum gebildet (Poulson, 1950; Turner und Mahowald, 1977). In dem von Kankel und Hall (1976) aufgestellten Anlageplan, der auf der Analyse gynandromorpher Tiere für die Enzymmarker Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6PGD) und saure Phosphatase beruht, finden sich die Anlagenbereiche für den adulten Vorderdarm und vorderen Mitteldarm nicht in einer ventralen, sondern eher in einer dorsalen Region des Vorderpols. Daß tatsächlich Zellen aus dem Vorderpolbereich Vorderdarm und vorderen Mitteldarm liefern, beweisen die nach homotoper Vorderpol → Vorderpol Transplantation in diesen Darmabschnitten gefundenen Mosaik.

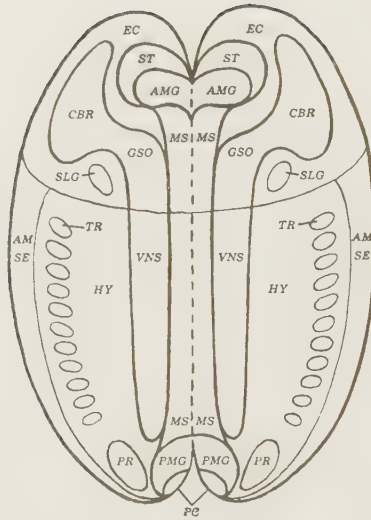


Abb.74 Anlageplan für das Drosophila-Ei nach Poulson
(1950, S. 246)

- AM = Amnion
- AMG = Vordere Mitteldarmanlage
- CBR = Gehirn
- EC = Ektoderm
- GSO = Suboesophagales Ganglion
- HY = Hypoderm
- MS = Mesoderm
- PC = Polzellen
- PMG = Hintere Mitteldarmanlage
- PR = Proctodäum
- SE = Serosa
- SLG = Speicheldrüse
- ST = Stomodäum
- TR = Tracheen
- VNS = Ventrales Nervensystem

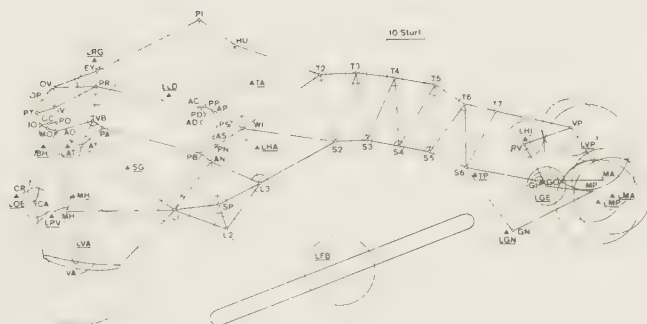


Abb.75 Morphogenetischer Anlageplan präsumptiver Bereiche für larvale und imaginale Strukturen, aufgestellt von Janning (1976, Abb. 7)

AC	= Vordere Scutelar-Borste	LVA	= Larvaler vorderer Mitteldarm
AD	= Vordere Dorsocentral-Borste	LVP	= Larvaler hinterer Mitteldarm
AN	= Vordere Notopleura-Borste	MA	= Vordere Malpighische Gefäße
AO	= Vordere Orbital-Borste	MH	= Mundhaken
AP	= Vordere Postalar-Borste	MO	= Mittlere Orbital-Borste
AS	= Vordere Supraalar-Borste	MP	= Hintere Malpighische Gefäße
AT	= Antenne	OC	= Ocellar-Borste
BH	= Gehirnhemisphäre	OP	= Occipital-Borsten
CA	= Cardia	OV	= Äußere Vertical-Borste
CR	= Kropf	PA	= Palpus
EY	= Auge	PB	= Presutural-Borste
GI	= Innere Genitalien	PD	= Hintere Dorsocentral-Borste
GN	= Gonaden	PI	= Proboscis
GO	= Äußere Genitalien	PN	= Hintere Notopleura-Borste
HU	= Humerus-Borsten	PO	= Hintere Orbital-Borste
IO	= Interocellar-Borsten	PP	= Hintere Postalar-Borste
IV	= Innere Vertical-Borste	PR	= Postorbital-Borsten
L ₁ -L ₃	= 1.-3. Bein	PS	= Hintere Supraalar-Borste
LAT	= Antennen-Imaginalscheibe	PT	= Postvertical-Borste
LFB	= Larvaler Fettkörper	PV	= Rectalklappe
LGE	= Genital-Imaginalscheibe	S ₂ -S ₆	= 2.-6. Sternit
LGN	= Larvale Gonaden	SG	= Speicheldrüse
LHA	= Halteren-Imaginalscheibe	SP	= Sternopleura-Borsten
LHI	= Larvaler Enddarm	T ₂ -T ₇	= 2.-7. Tergit
LLD	= Labial-Imaginalscheibe	TA	= Vordere Tracheenöffnung
LMA	= Larvale vordere Malpighische Gefäße	TP	= Hintere Tracheenöffnung
LMP	= Larvale hintere Malpighische Gefäße	VA	= Vorderer Mitteldarm
LOE	= Oesophagus	VB	= Vibrissen
LPV	= Proventrikel	V	= Hinterer Mitteldarm
LRG	= Ringdrüse	WI	= Flügel

Vergleich der homotopen Transplantationen

Der Anteil an Tieren, die nach homotoper Transplantation Darmmosaik zeigten, liegt für die Hinterpol → Hinterpol Transplantationsserie bei 24% und für die Vorderpol → Vorderpol Transplantationsserie bei 16%. Demnach wurden bei der homotopen Hinterpol → Hinterpol Transplantation Spenderzellen wesentlich häufiger im Darmgewebe integriert als bei der homotopen Vorderpol → Vorderpol Transplantation. Bei der Hinterpol → Hinterpol Serie konnten allerdings Mosaik im ektodermalen Enddarm nicht erfaßt werden; nach Vorderpol → Vorderpol Transplantation zeigten 2% der Tiere Mosaik ausschließlich im ektodermalen Vorderdarm. Die unterschiedlichen Mosaikraten für Mitteldarmgewebe lassen sich nicht durch unterschiedliche Überlebensraten der Empfänger in den beiden Transplantationsserien erklären; der Anteil an Tieren, die das III. Larvenstadium erreichten, in dem die Mehrzahl der Vorderpolempfänger dem Enzymtest unterworfen wurde, lag bei beiden Versuchsserien gleich hoch (Tabellen 7, 8). Eben- sowenig ist anzunehmen, daß Hinterpolzellen nach Transplan- tation häufiger überlebten als Vorderpolzellen.

Der wesentlich höhere Anteil an Mitteldarmmosaik nach homo- toper Hinterpol → Hinterpol Transplantation spricht vielmehr dafür, daß die hintere Mitteldarmanlage aus einer größeren An- zahl von Blastodermzellen gebildet wird als die vordere Mit- teldarmanlage. Zudem wurden bei der homotopen Hinterpol → Hin- terpol Transplantation auch Polzellen transplantiert, von denen einige möglicherweise im Mitteldarmgewebe integriert wurden. Darüber hinaus ist die hintere Mitteldarmanlage dem Hinterpol unmittelbar benachbart, wohingegen die vordere Mit- teldarmanlage vom Vorderpol geringfügig entfernt liegt (Turner & Mahowald, 1977).

Für die beiden homotopen Transplantationsserien Hinterpol → Hinterpol und Vorderpol → Vorderpol wurde beobachtet, daß bei 90% aller Tiere, die Spendergewebe zeigten, die Spenderzellen im Empfängergewebe integriert waren. Im Gegensatz dazu fand sich nach der homotopen Transplantation posteriorer Lateral- bereich → posteriorer Lateralbereich (0.15 Eilänge) nur bei

einem von acht Mosaiktieren (Mosaikrate 7.3%!) Integration (in den Malpighischen Gefäßen), die übrigen Tiere mit Spendergewebe wiesen freie Implantate auf (Tabelle 21). Dies zeigt, daß die Bedingung der homotopen Transplantation nicht hinreicht, hohe Mosaikraten und einen hohen Grad an Integration von Spenderzellen zu erhalten. Vielmehr müssen in einer Region, die sich für homotope Transplantationen eignen soll, auch Gewebe angelegt sein, die eine Spenderzellintegration größeren Ausmaßes ermöglichen. In der posterioren Lateralregion (0.15 Eilänge) scheint dies nicht der Fall zu sein. Auffallend ist, daß bei sechs von sieben Tieren mit nicht integrierten Spenderzellen mal⁺ Gewebe gefunden wurde, das nicht integriert, sondern an verschiedene abdominale Organe angelagert war. Möglicherweise sind die Anlagenbereiche der in dieser Eiregion angelegten inneren Organe verhältnismäßig klein, so daß Zellen daraus bei Transplantation schwerlich an die exakt homotope Stelle gelangten. Das Fehlen von Mitteldarmmosaiken in dieser Transplantationsserie bedeutet, daß Blastodermzellen aus der posterioren Lateralregion kaum mehr zur hinteren Mitteldarmanlage gehören, sondern daß sie diese Anlage nach vorne begrenzen.

Vergleicht man die Überlebensraten für Larven und Adulte der homotopen Transplantationsserien Hinterpol → Hinterpol und Vorderpol → Vorderpol mit denen der homotopen Transplantationsserie posteriorer Lateralbereich → posteriorer Lateralbereich, so ergeben sich für die zuletzt genannte Versuchsserie um bis zu 30% niedrigere Werte (Tabellen 7, 8, 10). Das bedeutet, daß diese posteriore Eiregion, unabhängig von der niedrigen Mosaik- und Integrationsrate, für die Transplantation von Blastodermzellen ungeeignet ist. Hingegen sind Hinterpol und Vorderpol für die Transplantation von Blastodermzellen sehr wohl geeignet. Sie ergaben bei guten Überlebensraten hohe Mosaikraten. Diese beiden Eiregionen dienten daher auch als bevorzugte Empfängerregionen für die heterotopen Transplantationen.

Heterotope Transplantationen

Empfängerregionen Hinterpol (Tabelle 18), Vorderpol (Tabelle 19) und posteriorer Latéralbereich (Tabelle 21)

Mit den homotopen Transplantationen wurde gezeigt, daß Blastodermzellen nach Transplantation in Blastodermstadien in das Empfängergewebe integriert werden können. Integration wurde nur dann beobachtet, wenn die Zellen in die ihrer Herkunft entsprechende oder eine benachbarte Eiregion injiziert wurden. Mit Hilfe der heterotopen Transplantation sollte nun geklärt werden, welche der zu Beginn aufgezeigten Möglichkeiten der Determination von Blastodermzellen die wahrscheinlichste ist (Seite 107). Nach Transplantation von Blastodermzellen aus verschiedenen heterotopen Regionen in den Hinterpol bzw. in den Vorderpol wurde sowohl Integration von Spenderzellen als auch autonome Entwicklung in Form von Implantaten beobachtet. Da die meisten der Implantate sehr klein waren, war es schwierig, sie bestimmten adulten Kutikularstrukturen zuzuordnen. Die Implantate, die identifiziert werden konnten, hatten mwh e Strukturen ausgebildet, die in der Herkunftsregion der Spenderzellen angelegt sein konnten. Besonders deutlich wird dies an einem Implantat, das mwh e Flügelzellen aufwies (Abb. 40) und das von Spenderzellen abstammte, die aus der lateralen Eimitte entnommen wurden. In der Blastodermregion der lateralen Eimitte sind prospektive Flügelzellen angelegt. Dies ist aus den Untersuchungen mehrerer Autoren zu schließen (Garcia-Bellido und Merriam, 1969; Janning, 1976; Mertens, 1977; Illmensee, 1978; Lohs-Schardin et al., 1979b; Szabad et al., 1979; Simcox und Sang, 1982, 1983).

Sehr wenige Implantate konnten eindeutig einer bestimmten Herkunftsregion zugeordnet werden; dies könnte daran gelegen haben, daß Zellen präsumptiver Chitinstrukturen in den hier am häufigsten gewählten Spenderregionen (Vorderpol, Hinterpol und 0.66 Eilänge) zwar nicht gänzlich fehlen, aber doch seltener vorhanden sind als etwa in der blastodermalen Eimitte. Der Anlagebereich sämtlicher adulter Thoraxstrukturen scheint in einer lateralen Region zu liegen, die sich von 0.51 - 0.57 Eilänge erstreckt (Lohs-Schardin et al., 1979a). Vorderpol

und Hinterpol des Blastoderms und möglicherweise auch die Region 0.66 Eilänge sind demgegenüber relativ arm an Vorläuferzellen für larvale und adulte Chitinstrukturen (Janning, 1976; Lohs-Schardin et al., 1979b). Nach Underwood et al. (1980) befinden sich die Anlagenbereiche aller larvalen und adulten Kutikularstrukturen von Kopf-, Thorax- und Abdominalsegmenten in einer Blastodermregion zwischen 0.15 und 0.7 Eilänge. Der von Kankel und Hall (1976) aufgestellte Anlageplan für das Blastoderm zeigt die präsumptiven Kutikularstrukturen des adulten Kopfes in einer anterioren lateralen Position, die jedoch deutlich posterior liegt zu den Anlagen für Vorderdarm und vorderen Mitteldarm.

Nach den zuletzt genannten Untersuchungen sollten in der Blastodermregion 0.66 Eilänge durchaus Vorläuferzellen der adulten Kutikula, nämlich die des Kopfes, zu finden sein. Spenderzellen insbesondere aus dem ventralen und lateralen Bereich 0.66 Eilänge lieferten denn auch nach heterotoper Transplantation Chitinstrukturen (Abb. 38, 41, 54), die aus dem Kopfbereich stammten, sie waren jedoch klein und schwer zu identifizieren.

Die herkunftsgemäße Entwicklung von Strukturen, die auf Grund der Farbe und/oder der Form der Borsten als von mwh e Spenderzellen abstammend erkannt wurden, zeigt, daß zumindest einige Blastodermzellen einer Region stabil determiniert sind. Die auf Seite 107 unter I formulierte Annahme, daß alle Blastodermzellen einer Region nicht stabil determiniert sein könnten, ist demnach nicht zutreffend. Die Frage ist nun, ob alle Blastodermzellen einer Region stabil determiniert sind (II) oder ob zwar die Mehrzahl der Blastodermzellen einer Region stabil determiniert ist, einige jedoch pluripotent sind (III). Sind alle Blastodermzellen einer Region stabil determiniert, so sollte bei heterotoper Transplantation eine Integration von Spenderzellen im Empfängergewebe nicht zu beobachten sein. Alle Spenderzellen sollten sich autonom gemäß ihrer Herkunftsregion entwickeln. Sind hingegen nicht alle Blastodermzellen einer Region stabil determiniert, sondern einige besitzen Pluripotenz, so wäre bei heterotoper Transplantation neben herkunftsgemäßer Entwicklung der stabil determinierten Spenderzellen auch Integration der pluripotenten Spenderzellen zu erwarten.

Da nach heterotoper Transplantation von Blastodermzellen in den Hinterpol und in den Vorderpol nicht nur autonome Entwicklung entsprechend der Herkunftsregion der Spenderzellen beobachtet wurde, sondern auch Integration von Spenderzellen, wäre anzunehmen, daß die auf Seite 107 unter III formulierte Hypothese zutrifft. Es fällt allerdings auf, daß nach heterotoper Transplantation sowohl in den Hinterpol als auch in den Vorderpol bis auf eine Ausnahme (Speicheldrüse nach Transplantation in den Vorderpol) Integration von Spenderzellen nur im Darmgewebe zu verzeichnen war (Tabellen 18 und 19). Trifft es zu, daß stets einige Blastodermzellen einer Eiregion pluripotent sind, dann würden die Ergebnisse der heterotopen Transplantationen in dieser Arbeit bedeuten, daß solche pluripotenten Zellen vor allem oder ausschließlich in Darmgewebe integriert werden können. Zu bedenken ist hier, daß Integration von Spenderzellen in einige andere innere Organe (z.B. Muskulatur, Nervensystem) nicht erkennbar war, da für deren Zellen keine Marker zur Verfügung standen. Dagegen sind Mitteldarmmosaiken in dem hier gewählten System leicht nachweisbar und wurden mit größter Wahrscheinlichkeit erfaßt, da selbst einzelne markierte Zellen zu erkennen sind.

Pluripotenz von Zellen im Blastodermstadium gilt als erwiesen - für die Polzellen. Von ihnen wird angenommen, daß sie nicht nur die Vorläufer der Keimzellen sind, sondern sich auch im Mitteldarmgewebe integrieren können. Einige Polzellen wandern außerdem durch die sich formende Blastodermzellschicht zurück zum Dottersack, wo sie unter Verlust der Zellmembran zu sogenannten tertiären Vitellophagen werden (Rabinowitz, 1941; Mahowald, 1962; Counce, 1963; Fullilove und Jacobson, 1978).

Zumindest einige Zellen der blastodermalen Zellschicht besitzen über das Anfangsstadium der Gastrulation hinaus cytoplasmatische Kontinuität mit dem Dottersack (Rickoll, 1975; Rickoll und Counce, 1980). Dem System von Mikrofilamenten, die diesen Cytoplasmabrücken benachbart liegen, wird von den Autoren eine entscheidende Rolle bei den Zellbewegungen während der Gastrulation zugeschrieben. Denkbar wäre, daß sich Zellen mit solchen Cytoplasmabrücken nach Transplantation in

eine heterotope Eiregion im Empfängergerewebe integrieren könnten, da ein Kontakt mit in dieser Region etwa vorhandenen determinativen Faktoren erleichtert wäre.

Die Häufigkeit, mit der nach heterotoper Transplantation in den Hinterpol bzw. in den Vorderpol Darmmosaik beobachtet wurden, war abhängig von der Spenderregion. Vorderpolzellen transplantiert in den Hinterpol und Hinterpolzellen transplantiert in den Vorderpol lieferten im Vergleich zu allen anderen heterotopen Transplantationen besonders hohe Mosaikraten. Trifft die unter III (Seite 107) genannte Hypothese der Pluripotenz einiger Blastodermzellen jeder Region zu, so wäre für die Polregionen ein höherer Anteil an pluripotenten Zellen zu fordern als für andere Regionen.

Das Vorhandensein besonders vieler pluripotenter Zellen, die sich nach heterotoper Transplantation im Darmgerewebe des Empfängers integrieren können, wäre somit für Regionen zu fordern, die ihrerseits nach homotoper Transplantation sehr viele Darmmosaik lieferten. Eine nach homotoper Hinterpol- und Vorderpoltransplantation gehäuft beobachtete Integration von Spenderzellen im Darmgerewebe entspricht der Erwartung, da die Polregionen den vorderen und hinteren Darmanlagen benachbart sind. Da sowohl im Vorderpolbereich als auch im Hinterpolbereich Darmanlagen vorhanden sind, ist es nun durchaus denkbar, daß bei der heterotopen Vorderpol → Hinterpol Transplantation Blastodermzellen, die aus der vorderen Mitteldarmanlage stammten, in den Hinterpol transplantiert wurden und sich dort in der hinteren Mitteldarmanlage integrierten und vice versa. Blastodermzellen aus dem Hinterpol und aus dem Vorderpol zeigten selbst nach Transplantation in den Hinterpol von nicht-zellulären Präblastodermstadien Integration im hinteren Mitteldarm (Tabelle 22), wenn auch mit geringerer Häufigkeit als nach entsprechender homotoper bzw. heterotoper Transplantation ins zelluläre Blastoderm.

Um die Integration von Spenderzellen im Empfängerdarm nach heterotoper Pol → Pol Transplantation zu erklären, bedarf es demnach nicht unbedingt der unter III genannten Annahme, einige Blastodermzellen einer Region seien pluripotent.

Vielmehr können alle Blastodermzellen einer Region stabil determiniert sein (II), Zellen gleicher prospektiver Bedeutung müssen jedoch in verschiedenen Eiregionen vorhanden sein. Dies scheint für die Vorläuferzellen des Mitteldarms zu gelten.

Geht man davon aus, daß prospektive Mitteldarmzellen auf Grund ihres gleichen Determinationszustandes in Mitteldarmanlagen integriert werden, so sollte die Häufigkeit, mit der nach heterotoper Transplantation in die Polbereiche Mitteldarmmosaik gefunden werden, etwas über die Verteilung dieser prospektiven Mitteldarmzellen im Blastoderm aussagen. Spenderzellen aus der Ventral- und Lateralregion im vorderen Eidrittel (0.66 Eilänge) waren nach heterotoper Transplantation in den Hinterpol bzw. Vorderpol in wenigen Fällen im Mitteldarm nachweisbar, solche aus dem Ventralbereich häufiger (3 Tiere) als solche aus den Lateralbereich (1 Tier); Zellen aus der Dorsalregion (0.66 Eilänge) konnten im Darmgewebe nicht nachgewiesen werden (Tabellen 18 und 19). Nach den blastodermalen Anlageplänen von Poulson (1950) und Janning (1976) sind in der Dorsalregion Darmanlagen nicht vorhanden, wohl aber in einem anterioren ventralen Bereich (Abb. 74, 75). Im Anlageplan von Janning umfaßt die vordere Mitteldarmanlage eine große Kreisfläche ventral zwischen dem Vorderpol und etwa 0.75 Eilänge. Ob sich die vordere Mitteldarmanlage posterior bis in eine Region von 0.66 Eilänge erstreckt, ist ungewiß; möglicherweise wurden Spenderzellen nicht immer genau aus der Region 0.66 Eilänge, sondern bisweilen auch geringfügig anterior davon entnommen.

Blastodermzellen, die aus dem anterioren Lateralbereich in 0.8 Eilänge stammten, wurden nach Transplantation in den posterioren Lateralbereich (0.15 Eilänge) bei zwei Empfängern in den hinteren Mitteldarm integriert (Tabelle 21). Dies entspricht einer Integrationsrate, die um das Vierfache über der von Zellen aus der posterior liegenden Lateralregion in 0.66 Eilänge liegt. Das Ergebnis dieser Transplantationsserie zeigt zum einen, daß vermutlich einige Zellen aus der vorderen Lateralregion in 0.8 Eilänge prospektive Mitteldarmzellen sind, und zum anderen, daß die hintere Mitteldarmanlage sich lateral nach vorn bis in etwa 0.15 Eilänge erstreckt.

Nach heterotoper Hinterpol → Vorderpol Transplantation wurden Spenderzellen nicht nur in den vorderen Mitteldarm sondern auch in den Vorderdarm integriert. Möglicherweise wurden Blastodermzellen aus dem Bereich des Proctodäums, das den ektodermalen Enddarm liefert, in den Bereich des Stomodäums, das den ektodermalen Vorderdarm liefert, eingebaut. Wie für die Integration prospektiver Mitteldarmzellen in Mitteldarmanlagen angenommen, könnten auch Zellen der prospektiven ektodermalen Darmabschnitte auf Grund eines ähnlichen Determinationszustandes in ektodermale Darmanlagen integriert werden. Ob sich Zellen aus den Mitteldarmanlagen auch in ektodermalen Darmanlagen und Zellen aus den ektodermalen Darmanlagen in Mitteldarmanlagen integrieren, läßt sich mit den hier gewonnenen Ergebnissen nicht eindeutig klären. Mosaik in ektodermalen Darmabschnitten wurden nur nach Transplantation von Zellen aus Spenderregionen, die ektodermale Darmanlagen aufweisen, beobachtet. Dieser Befund beweist zwar nicht, daß einzelne Zellen aus den Spenderregionen Vorderpol und Hinterpol stabil determiniert sind, ektodermalen Darm zu liefern, er legt dies aber doch nahe.

Eine Integration von Spenderzellen in andere innere Organe als den Darm wurde nach heterotoper Transplantation in die Polregionen nur für einen Fall nachgewiesen: Nach Transplantation von Blastodermzellen aus dem Lateralbereich 0.66 Eilänge in den Vorderpol zeigte eine larvale Speicheldrüse Aldehyd-Oxidase-Aktivität, während die zweite Speicheldrüse ungefärbt blieb (Abb. 56). Larvale Speicheldrüsen zeigen im Wildtyp kein einheitliches Aktivitätsmuster der Aldehyd-Oxidase; in der mal Mutante färben sie sich im Enzymtest nicht an. Dickinson (1971, 1975) beschrieb für die von ihm untersuchten Tiere eine schwache Enzymaktivität der larvalen Speicheldrüsen, wohingegen bei den von Janning (1975, 1976) analysierten Gynanderstämmen die Aldehyd-Oxidase-Aktivität dieser Organe ausreichend hoch war, um männliches (mal) Gewebe und Mosaikgewebe erkennen zu lassen.

In den von Poulson (1950) und von Janning (1976) aufgestellten Anlageplänen für Larval- und Adultstrukturen finden sich die Primordien für die larvalen Speicheldrüsen in der anterioren Ventrolateralregion, bei Poulson auf etwa 0.66 Eilänge und bei

Janning auf etwa 0.7 - 0.75 Eilänge. Es ist deshalb möglich, daß Spenderzellen aus der anterioren Lateralregion aus dem Bereich der Speicheldrüsenprimordien entnommen wurden. In der Empfängerregion des Vorderpols sind hingegen Speicheldrüsenanlagen nicht anzunehmen, in die prospektive Speicheldrüsenzellen integriert werden könnten. Die paarigen Invaginationen im ventrolateralen Ektoderm, die im 7-8 h alten Embryo als erste Speicheldrüsenanlagen gebildet werden, wandern im Verlauf der Involution des Kopfes ins Stomodäum. Die Ausführungsgänge der sich schlauchförmig ausdifferenzierenden Drüsenkörper vereinen sich zum unpaaren Ausführungsgang, der im 16 h alten Embryo in den Boden des Pharynx mündet. Der Pharynx gilt als Abkömmling des Stomodäums (Fullilove und Jacobson, 1978). Man könnte nun annehmen, daß zwischen prospektiven Speicheldrüsenzellen und Zellen der Stomodäumsanlage - beide Organe werden vom Ektoderm gebildet - eine Verwandtschaft besteht, die hinreicht, eine Anlagerung (und autonome Entwicklung) von transplantierten prospektiven Speicheldrüsenzellen an Material des Stomodäums zu ermöglichen. Alternativ dazu müßte eine gezielte Wanderung der transplantierten Zellen in die ventrolaterale Region der Speicheldrüsenanlagen angenommen werden - eine stabile Determination dieser Zellen zu prospektiven Speicheldrüsenzellen vorausgesetzt.

Möglicherweise können stabil determinierte Blastodermzellen nach Transplantation in das Blastoderm wandern, bis sie Bereiche eines ihrem eigenen entsprechenden Determinationszustandes erreichen. Eine solche Fähigkeit könnten alle Blastodermzellen besitzen, unabhängig von ihrer spezifischen Determination. Zumindest Zellen, die Chitinstrukturen liefern, scheinen jedoch nicht zu wandern, denn Implantate mit Chitinstrukturen wurden in Larven und Adulten meist im Bereich der Injektionsstelle gefunden (Illmensee, 1978; Simcox und Sang, 1982, 1983; und eigene Beobachtungen). Kerne aus dem Präblastoderm bleiben nach Transplantation ins Präblastoderm an der Injektionsstelle liegen (Kauffman, 1980). Es ist allerdings möglich, daß sich Blastodermzellen anders verhalten als Präblastodermkerne. So erreichen zum Beispiel in die ventrale Eimitte transplantierte Polzellen auch von dieser Position aus

die Gonaden (Illmensee et al., 1976). Polzellen zeigen jedoch im Vergleich zu Blastodermzellen eine erhöhte Mobilität (Fullilove und Jacobson, 1978). Die in den verschiedenen Transplantationsserien erhaltenen Ergebnisse erlauben nicht, eine potentielle Mobilität von transplantierten Blastodermzellen völlig auszuschließen, doch wurde eine Integration von Spenderzellen im allgemeinen nur für jene Organe beobachtet, deren Primordien entsprechend den Anlageplänen der jeweiligen Injektionsstelle benachbart liegen. Eine Wanderung prospektiver Speicheldrüsenzellen erscheint daher als nicht sehr wahrscheinlich.

Allerdings wurde nach heterotoper Transplantation ein weiterer Fall beobachtet, der ein gewisses Wanderungsvermögen transplantiertter Blastodermzellen zumindest nicht ausschließt. Nach Transplantation von Zellen aus der Ventralregion 0.66 Eilänge in den Vorderpol zeigten bei einem Tier beide Coxen des ersten Beinpaares an sich entsprechenden Stellen schwarzgefärbte Zellbereiche (Abb. 55). Da Feinstrukturen nicht erkennbar waren, ließ sich eine Übereinstimmung mit in der Spenderregion angelegten Chitinstrukturen nicht feststellen. Wie diese Spenderzellen, die sicherlich aus einer vom Vorderpol verschiedenen Segmentanlage entnommen wurden, in den Bereich des ersten Beinpaares gelangten, muß offen bleiben.

Daß eine Integration von Spenderzellen in Chitinstrukturen des Empfängers nicht notwendigerweise eine gleiche segmentale Determination von Spenderzellen und Empfängerregion voraussetzt, zeigen Ergebnisse von Simcox und Sang (1982, 1983). Blastodermzellen aus der lateralen Eimitte, die eine von der posterioren Lateralregion verschiedene segmentale Determination besitzen (Lohs-Schardin et al. 1979b), integrieren sich nach heterotoper Transplantation in die posteriore Lateralregion bisweilen in Chitinstrukturen des Empfängers; sie entwickeln sich dabei aber trotzdem herkunftsgemäß.

Es ist zunächst überraschend, daß nach Transplantation von Zellen aus dem Ventralbereich 0.66 Eilänge in den Vorderpol,

schwarz gefärbte Bereiche (Spendermaterial) an identischen Stellen der beiden ersten Beine auftreten. Die Imaginalanlagen des ersten Beinpaars, die sich in der frisch geschlüpften 1. Larve als Verdickungen des ventralen Hypoderms erkennen lassen, sind in diesem und in allen folgenden larvalen Entwicklungsstadien basal verschmolzen. Im Gegensatz dazu liegen die Imaginalanlagen der übrigen thorakalen Organe voneinander getrennt und verschmelzen erst während der Metamorphose (Bodenstein, 1950). Paariges Auftreten von Spendergewebe an sich genau entsprechenden basalen Beinabschnitten wäre dann nicht überraschend, wenn sich der Anlagenbereich des ersten Beinpaars über die ventrale Mittellinie hin erstreckte und Spenderzellen in eben diese Region gelangen konnten. Geht man aber davon aus, daß die Primordien des ersten Beinpaars im Blastoderm ventral getrennt sind, dann hätten Spenderzellen vermutlich nur in einen der beiden Anlagebereiche integriert werden können. Die Primordien des ersten Beinpaars fusionieren durch die Invagination des ventralen Mesoderms während der Gastrulation (Wieschaus, 1978). Dadurch konnten Spenderzellen, die in einen Anlagenbereich integriert waren, vielleicht auch in die Anlage des anderen Beins einwachsen.

Empfängerregion Eimitte (Tabelle 20)

In einer weiteren Transplantationsserie sollte nochmals getestet werden, ob nicht vielleicht doch nach heterotoper Transplantation Integration und ortsgemäße Differenzierung von Spenderzellen in externe Adultstrukturen zu beobachten wäre, d.h. ob Pluripotenz einiger Blastodermzellen möglicherweise doch nachgewiesen werden könnte. Als Empfängerregion wurde die Eimitte gewählt, da hier die Anlagen für den adulten Thorax auf verhältnismäßig engem Raum liegen (Lohs-Schardin et al. 1979a). Deshalb dürfte die Wahrscheinlichkeit für eine Integration in präsumptive Chitinbereiche groß sein. Der Vorderpol diente als Spenderregion, da er räumlich weit genug entfernt ist vom mittleren Eibereich und zudem bereits in heterotoper Transplantation getestet worden war.

Die Transplantation von Vorderpolzellen in die ventrale, laterale und dorsale Eimitte erbrachte keinen Hinweis auf eine Pluripotenz von Blastodermzellen. In keinem der Tiere wurden in Chitinbereiche integrierte Spenderzellen beobachtet, die sich entsprechend ihrer neuen Umgebung differenziert hätten. Ein Tier, dem Vorderpolzellen in die laterale Eimitte transplantiert worden waren, wies im linken Flügel eine chitinöse Struktur auf, einem Knäuel von Haarzellen ähnelnd, die aber wohl nicht echt integriert war, sondern eher von den beiden Flügelflächen eingeschlossen schien (Abb. 62). Dasselbe Tier zeigte zusätzlich ein Mitteldarmmosaik. Um diesen Befund zu erklären, bedarf es nicht der Annahme, einige Blastodermzellen einer Region seien pluripotent. Sinnvoller ist die Annahme, daß die transplantierten Zellen verschiedenen Zellpopulationen entstammten. Mindestens eine der Spenderzellen wäre dabei als prospektive Mitteldarmzelle und eine andere als prospektive Kutikulazelle anzusehen. Wie aus den Ergebnissen der zuvor diskutierten homotopen und heterotopen Transplantationsserien zu schließen ist, sind beide Zelltypen am Vorderpol des Blastoderms vorhanden.

Daß nicht nur bei dem erwähnten Tier, sondern bei etwa 10% der Tiere, die im Blastodermstadium Vorderpolzellen in die Eimitte transplantiert erhielten, Integration von Spenderzellen im Mitteldarm beobachtet wurde, überrascht nicht wegen der Spenderregion, die ja prospektive Mitteldarmzellen zu liefern vermag, sondern wegen der Entwicklungsleistung der Empfängerregion. Unter der Annahme, daß Mitteldarmmosaiken nur gefunden werden, wenn prospektive Mitteldarmzellen des Spenders in Mitteldarmanlagen des Empfängers integriert werden, und weiter, daß Spenderzellen im Empfänger nicht über größere Entfernungen wandern, wären für die mittlere Region des Blastoderms Zellbereiche zu fordern, die später Mitteldarmgewebe liefern. Es wären prospektive Zellbereiche sowohl für den vorderen als auch für den mittleren Mitteldarm zu fordern, es sei denn, die vordere Mitteldarmanlage selbst hätte eine wesentlich größere Ausdehnung als auf Grund des Umfangs der Invagination bisher angenommen wurde. Wenn hier von vorderem, mittleren und hinterem Mitteldarm gesprochen wird, ist zu berücksichtigen, daß diese Einteilung mehr oder

weniger willkürlich ist, da keine klaren Grenzen gegeben sind und die Darmabschnitte sich morphologisch nicht eindeutig unterscheiden.

Sollte sich die vordere Mitteldarmanlage tatsächlich bis zur Eimitte erstrecken, so wäre nach heterotoper Transplantation von Blastodermzellen aus der Ventral- und möglicherweise auch Lateralregion (0.66 Eilänge) theoretisch ein erhöhter Anteil von Tieren mit Mitteldarmmosaik zu erwarten gewesen. Tatsächlich wurden Blastodermzellen aus diesen Spenderregionen nach Transplantation in Vorder- und Hinterpol nur vereinzelt im Darmgewebe integriert. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit dahingehend interpretiert, daß diese Spenderregionen sehr selten prospektive Mitteldarmzellen liefern, zumindest seltener, als es für eine in diese Region sich erstreckende Mitteldarmanlage zu erwarten wäre. Illmensee et al. (1976) beschrieben, daß in den Hinterpol transplantierte Blastodermzellen aus der ventralen Eimitte vereinzelt im Mitteldarm integriert wurden. Sie schrieben diese Beobachtung einer vielleicht vorhandenen Pluripotenz solcher Spenderzellen zu. Möglicherweise könnten diese Zellen aber auch prospektive Mitteldarmzellen gewesen sein, die im Blastoderm in der Eimitte vorhanden sein könnten.

Bei einigen Larven, denen im Blastodermstadium Vorderpolzellen in die ventrale und laterale Eimitte transplantiert worden waren, fanden sich außergewöhnlich stark proliferierende vordere Mitteldarmabschnitte; eines dieser Tiere wies gleichzeitig Aldehyd-Oxidase positive Zellen im vorderen Mitteldarm auf. Die Entwicklung des larvalen vorderen Mitteldarms konnte demnach durch Injektionen in die ventrale und laterale Eimitte gestört werden. Das Auftreten von Mitteldarmdefekten bei Tieren dieser Transplantationsserien spricht dafür, daß in dieser Region Primordien des betreffenden Organs vorhanden sind, die durch Injektion von Fremdmaterial in ihrer Entwicklung beeinträchtigt wurden.

Eine mittlere Mitteldarmanlage, die etwa in einem mittleren Eibereich des Blastoderms liegen könnte, gibt es in den Anlagendiagrammen von Poulson (1950) und Janning (1976) nicht (Abb. 74, 75). In der Eimitte ist auch keine Invagination von Zellen zu

beobachten, die der der vorderen und hinteren Mitteldarmanlage vergleichbar wäre. Poulson (1950) sowie Fullilove und Jacobson (1978) gehen vielmehr davon aus, daß Vitellophagen und Polzellen, welche nicht in die Gonaden gelangten, den mittleren Mitteldarm gemeinsam bilden. Zellen der hinteren Mitteldarmanlage wachsen danach im 7-9 h alten Embryo laterad nach vorne, schließen die Vitellophagen und Polzellen ein und verschmelzen nach der Keimstreifverkürzung mit den nach hinten wachsenden Ästen der vorderen Mitteldarmanlage. Zellen der hinteren und vorderen Mitteldarmanlage sollen gemeinsam den Dottersack zuerst ventral und später dorsal umfassen und so ein durchgehendes Mitteldarmepithel bilden.

Der mittlere Mitteldarm entstünde demnach nicht aus Blastodermzellen und wäre damit vermutlich eines der wenigen, wenn nicht das einzige Organ der Soma-Linie, dem keine Primordien auf der Blastodermoberfläche zugesprochen werden könnten. Das Auftreten von Aldehyd-Oxidase positiven Spenderzellen im mittleren und vorderen Mitteldarm, sowie die Defektbildung des vorderen Mitteldarms nach heterotoper Transplantation von Vorderpolzellen in die blastodermale Eimitte sprechen aber dafür, daß Blastodermzellen der Eimitte zur Bildung des vorderen und mittleren Mitteldarms beitragen. Solche blastodermalen Vorläuferzellen des vorderen und mittleren Mitteldarms müßten in der Eimitte sowohl ventral als auch lateral und dorsal angelegt sein.

Bei einem Tier aus der Transplantationsserie Vorderpol → dorsale Eimitte wurde Aldehyd-Oxidase-Aktivität in den Malpighischen Gefäßen beobachtet. In den Anlageplänen von Poulson (1950) und von Janning (1976) sind in der dorsalen Eimitte Anlagen für Malpighische Gefäße ebenso wenig enthalten wie in der Herkunftsregion der Zellen, dem Vorderpol. Daher läßt sich das Auftreten von Aldehyd-Oxidase-Aktivität in den Malpighischen Gefäßen dieses Wirtstieres nur schwer erklären. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß das Aldehyd-Oxidase-positive Material wahrscheinlich in die Malpighischen Gefäße nur eingelagert und nicht echt integriert ist (Abb. 65); es läßt sich nämlich kein Schwarz-Weiß-Zellmuster erkennen, wie es

sonst bei Malpighischen Gefäßen mit Mosaikcharakter üblich ist (Abb. 31). Das normale Zellmuster der Malpighischen Gefäße könnte bei diesem Tier allerdings durch die schweren Defektbildungen gestört worden sein. Im Enzymtest sich anfärbendes Material, das sich außerhalb eines Zellverbandes befand, wurde gelegentlich auch bei anderen Tieren beobachtet, vornehmlich nach homotoper Transplantation in den posterioren Lateralbereich, wie auch nach heterotoper Transplantation aus der Dorsalregion (0.66 Eilänge) in den Hinterpol. Zellen präsumptiver innerer Organe müssen sich demnach nicht notwendigerweise in Wirtsgewebe integrieren, sondern können sich wahrscheinlich ebenso separat entwickeln wie Zellen präsumptiver Kutikularstrukturen, für die eine autonome Entwicklung in Form eines Implantats häufig zu beobachten war.

Im Fall der defekten Malpighischen Gefäße mit Aldehyd-Oxidase-Aktivität stellt sich die Frage, wie die in die dorsale Eimitte transplantieren Vorderpolzellen von der Injektionsstelle aus in die Malpighischen Gefäße gelangen konnten. Die paarigen Ausstülpungen, aus denen sich die Malpighischen Gefäße entwickeln, entstehen im 5-6 h alten Embryo an der Grenze von hinterem Mitteldarm und Proctodäum. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich invaginierte hintere Mitteldarmanlage und Proctodäum auf der dorsalen Eiseite, in 0.5 - 0.7 Eilänge, wohin sie im Zuge der Keimstreifverlängerung gelangt sind (Poulson, 1950; Fullilove und Jacobson, 1978). Möglicherweise blieben Vorderpolzellen, die ja durchaus Vorläuferzellen innerer Organe sein können, neben der Blastodermzellschicht liegen, ohne sich in der dorsalen Eimitte im Blastoderm zu integrieren. Möglich ist, daß solche Zellen bei der späteren Entstehung der Malpighischen Gefäße in dieser Eiregion in die neu angelegten Organe gelangten und deren Entwicklung störten. Das Auftreten von Enzymaktivität in den Malpighischen Gefäßen nach heterotoper Transplantation in die dorsale Eimitte könnte andererseits auch darauf hindeuten, daß sich der Anlagebereich der Malpighischen Gefäße im Blastoderm dorsal weiter nach vorne erstreckt als dies nach dem Anlageplan von Janning (1976) zu erwarten wäre.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben es, hinsichtlich der Determination von Blastodermzellen und der Verteilung determinierter Zellen im Blastoderm einige Aussagen zu machen. Die auf Seite 107 aufgestellte Hypothese I ist abzulehnen. Es trifft sicher nicht zu, daß alle Blastodermzellen einer Region nicht-stabil determiniert sind. Dies ist dadurch bewiesen, daß nach heterotoper Transplantation in den Empfängern Implantate mit herkunftsgemäßer Entwicklung gefunden wurden. Illmensee (1976, 1978) und Simcox und Sang (1982, 1983) berichten über ähnliche Beobachtungen. Es muß demnach davon ausgegangen werden, daß zumindest ein Teil der Blastodermzellen einer Region stabil determiniert ist. Ob nun alle Blastodermzellen einer Region stabil determiniert sind - Hypothese II, Seite 107 -, oder zum Beispiel nur solche, die Chitinstrukturen liefern, wobei der Rest der Blastodermzellen pluripotent wäre - Hypothese III, Seite 107 -, ist nicht eindeutig zu entscheiden.

Die Ergebnisse - herkunftsgemäße Entwicklung und Integration von Spenderzellen nach heterotoper Transplantation - scheinen die Hypothese III zu bestätigen. Da aber eine echte Integration von Spenderzellen (mit ortsgemäßer Entwicklung) bis auf einen Fall (Speicheldrüse, siehe S. 121) nur in Empfängerorganen beobachtet wurde, für die wenigstens zwei verschiedene Anlagebereiche im Blastoderm vorhanden sind (endodermaler und ektodermaler Darm), wird hier die Hypothese II als die wahrscheinlich richtige angesehen. Dies bedeutet, daß alle Blastodermzellen einer Region stabil determiniert sind, daß aber Zellen mit gleicher Determination (z.B. Mitteldarm) in verschiedenen Regionen des Blastoderms vorhanden sind. Solche Zellen können sich, eine Pluripotenz vortäuschend, auch nach heterotoper Transplantation im Empfängergewebe integrieren, sofern sie zu Zellen gleicher Determination gelangen.

Die Häufigkeit, mit der sich Spenderzellen nach heterotoper Transplantation im Darmgewebe des Empfängers integrieren, war abhängig von der gewählten Kombination von Spender- und Empfängerregion. Das erlaubt es, Schlüsse zu ziehen hinsichtlich der Verteilung prospektiver Darmzellen im Blastoderm. Danach sind am Vorder- und Hinterpol besonders viele prospektive Mittel-

darmzellen vorhanden. Für den Vorderpol sind auch prospektive Vorderdarmzellen zu fordern. Diese Befunde entsprechen den Erwartungen, die man auf Grund der von Poulson (1950) und von Janning (1976) aufgestellten Anlagepläne (Abb. 74, 75) und der Beobachtungen von Turner und Mahowald (1977) hat. Aus der Häufigkeit, mit der nach Vorderpol + Eimitte Transplantation Mitteldarmmosaik auftraten, ist zu schließen, daß prospektive Mitteldarmzellen auch in der Eimitte vorhanden sind; ein Befund, der nicht den Anlageplänen von Poulson und Janning entspricht.

Verglichen mit dem häufigen Auftreten von Spenderzellen im Darmgewebe wurde von prospektiven Chitinzellen abstammendes Spendergewebe wesentlich seltener gefunden. Dies ist zum einen dadurch zu erklären, daß die gewählten Spenderregionen nicht unbedingt der Blastodermregion entsprachen, die potentiell die meisten prospektiven Chitinzellen liefert (vermutlich mittlerer Blastodermbereich). Zum anderen ist zu vermuten, daß die prospektiven Anlagenbereiche der einzelnen Organsysteme im Blastoderm von unterschiedlicher Ausdehnung sind. Nach den Mosaikraten zu schließen, umfassen die prospektiven Darmbereiche, insbesondere die vordere und hintere Mitteldarmanlage, verhältnismäßig viele Zellen, während die Primordien der adulten kutikulären Strukturen nur aus wenigen Zellen bestehen.

Die Epidermis der Larvalsegmente vom 1. Thorax- bis zum 7. Abdominalsegment entsteht aus einer Blastodermregion, deren Ausmaß auf etwa 2000 Zellen geschätzt wurde (Szabad et al., 1979; Lohs-Schardin et al., 1979b), was ungefähr einem Drittel aller Blastodermzellen entspricht (Turner und Mahowald, 1976; Zalokar und Erk, 1976). Doch nicht alle dieser Zellen liefern larvale Kutikula (etwa 60-70% nach Lohs-Schardin et al. 1979b), ein Teil der Zellen ist den Vorläuferzellen der adulten Kutikula zuzurechnen. Letztere scheinen, zumindest im Abdomenbereich, als kleine Zellgruppen zwischen den präsumptiven larvalen Epidermiszellen zu liegen (Szabad et al., 1979). Diese Zellgruppen der präsumptiven abdominalen Histoblasten umfassen pro Histoblastenprimordium 10-20 Blastodermzellen (Madhavan und Schneiderman, 1977). Für die Imaginalanlagen wurden ebenfalls 10-20 Blastodermzellen pro Primordium errechnet (Wieschaus und Gehring, 1976; Wieschaus, 1978; Merriam, 1978).

Demgegenüber ist die Anzahl von Blastodermzellen, die beispielsweise die vordere oder hintere Mitteldarmanlage bilden, nicht bekannt. Der Anlageplan von Janning (1976) liefert Hinweise hinsichtlich der Größenordnung der einzelnen Organanlagen. Die Kreisfläche der vorderen Mitteldarmanlage hat zum Beispiel den 4-5 fachen Radius und die der hinteren Mitteldarmanlage den 2-3 fachen Radius der Kreisflächen, die die Flügel- und Beinprimordien sowie die präsumptiven abdominalen Histoblasten darstellen. Dies zeigt, daß die Anlagen des vorderen und hinteren Mitteldarms wesentlich mehr Blastodermzellen umfassen müssen als die Primordien der adulten Thorakalorgane und der Abdominalsegmente.

Die Anlage und Ausdifferenzierung von Segmenten spielt bei der Ektodermentwicklung von *Drosophila* eine wichtige Rolle (Ripoll, 1972; Steiner, 1976; Lawrence und Morata, 1977; Wieschaus, 1978; Garcia-Bellido und Ripoll, 1978). Blastodermzellen, die larvale und adulte Kutikula liefern, sind bestimmten Segmenten zugeordnet, wobei auch anteriore und posteriore Kompartimente eines Segmentes festgelegt sind. Da die Segmentierung das auffallendste Merkmal der Körperoberfläche von Insekten ist (Wieschaus, 1978) und bei *Drosophila* bereits im 7-8 h alten Embryo äußerlich erkennbar ist (Turner und Mahowald, 1977), ist eine frühe Determination der Segmente zu erwarten.

Ob und wie weit auch innere Organe segmental angelegt werden, ließ sich bislang nicht völlig klären. Zumindest für das Nervensystem und die Oenocyten scheint eine segmentale Anlage gegeben zu sein (Kankel und Hall, 1976; Deák, 1977; Ghysen et al., 1983). Das überrascht nicht sonderlich, da das Nervensystem wie auch die Oenocyten allgemein als vom Ektoderm abstammend betrachtet werden. Für Organe mesodermalen und endodermalen Ursprungs hingegen ist eine segmentale Anlage nicht bewiesen; denkbar wäre, daß die Segmentierung als Entwicklungsvorgang auf Zellen des Ektoderms begrenzt ist (Wieschaus, 1978). Zellen der vorderen und hinteren Mitteldarmanlage, die wahrscheinlich den Großteil der endodermalen Zellen liefern, lassen keinerlei segmentale Organisation bzw. Restriktion erkennen. Blastodermzellen aus dem Vorderpol wurden ja nach Transplanta-

tion in den Hinterpol und in die Eimitte in den mittleren und hinteren Mitteldarm integriert und solche aus dem Hinterpol wurden nach Transplantation in den Vorderpol in den vorderen Mitteldarm integriert. Allerdings scheint nach Simcox und Sang (1982, 1983) eine Integration von sich herkunftsgemäß differenzierenden Blastodermzellen in ektodermalen Organen selbst dann möglich zu sein, wenn Spenderzellen und Empfängerregion den Anlageplänen nach nicht zum selben oder zu unmittelbar benachbarten Segmenten gehören. Demnach kann nicht davon ausgegangen werden, daß Blastodermzellen nur dann integriert werden, wenn die Spenderzellen und die Zellen der Empfängerregion entweder zum gleichen Segment gehören oder keine segmentale Determination besitzen. Ob der Mitteldarm segmental angelegt wird oder nicht, bleibt daher offen, wenngleich das häufige Auftreten von Mitteldarmmosaiken nach heterotoper Transplantation eine nicht-segmentale Anlage des Mitteldarms nahelegt.

Transplantation von Zellen aus Kultur

Drosophila-Zellen, die in Kultur gehalten werden, teilen sich kontinuierlich und differenzieren sich nicht. Sie verhalten sich darin wie embryonale Zellen. Die hier beschriebenen Drosophila Zell-Linien stammen von Embryonen ab. Ob diese Zellen tatsächlich embryonalen Charakter besitzen, sollte an ihrer Fähigkeit geprüft werden, sich nach Transplantation in Drosophila-Eier früher Entwicklungsstadien zu differenzieren. Dabei könnten sie im Wirtsgewebe integriert werden oder sich separat entwickeln.

In Kultur gehaltene Zellen verändern sich im Verlaufe von Generationen. Daher wurden sowohl Zellen jüngerer als auch Zellen älterer Zell-Linien im Transplantationsexperiment getestet. Kulturzellen zeigen insbesondere im Karyotyp oft erhebliche Veränderungen gegenüber der Ausgangssituation (etwa gleich großer Anteil von XX und XY Zellen, diploid; siehe erster Teil der Diskussion). Deshalb wurden solche Zell-Linien als Spender ausgewählt, für die geringe Änderungen im Karyotyp zu beobachten waren.

Embryonen, denen Zellen aus Kultur implantiert wurden, hatten im Vergleich zu Empfängern von Blastodermzellen deutlich verringerte Überlebenschancen. Dies galt besonders für Spenderzellen aus älteren Zell-Linien. Wie Kontrollinjektionen mit reinem Zellkultur-Medium ohne Zellen zeigten, war dieser toxische Effekt nicht allein durch in die Embryonen gelangtes Medium bedingt. Daneben zeigte sich, daß adulte Weibchen, denen Zellen älterer Zell-Linien in das Abdomen injiziert wurden, nicht länger als 8 Tage lebten. Weibchen, denen Blastodermzellen oder reines Medium injiziert wurden, lebten jedoch 3-4 Wochen. Diese Tiere hatten selbst nach 3-4 Wochen noch ein völlig normales Aussehen, wohingegen Weibchen nach Injektion von Kulturzellen binnen weniger Tage stark aufgetriebene, bräunlich verfärbte Abdomen aufwiesen, verursacht durch einen stark aufgeblähten Mitteldarm oder Kropf. Gateff (1978) beschrieb ein sogenanntes "bloating syndrome" der Abdomen von Weibchen, denen transplantierbare maligne Neuroblastomzellen injiziert worden waren. In Weibchen, denen Zellen der hier beschriebenen Zell-Linien injiziert worden waren, fanden sich allerdings keine Tumore (Gateff, persönliche Mitteilung).

Zellen einer embryonalen Zell-Linie der Schaben-Spezies *Blattella germanica* führten nach Transplantation in larvale und adulte Tiere derselben Spezies zu Tumoren, die den Tod der Wirtstiere verursachten (Tsang und Brooks, 1980). Diese bösartigen Tumore produzierten Metastasen und waren in Sekundärwirte transplantierbar; aus ihnen entnommene Zellen konnten wieder in Zellkultur gehalten werden. Diese Beobachtungen legen nahe, daß die embryonale Zell-Linie von *Blattella germanica* in eine Tumor Zell-Linie transformiert worden war. Bei Injektion von zellfreiem gebrauchtem Medium oder von homogenisierten Zellen entstanden keine Tumore. Demgegenüber zeigten *Drosophila*-Weibchen, denen zellfreies gebrauchtes Medium der Zell-Linien Sa_1 , $z\ spl_1$, Hi_1 und $2/10_1$ in die Abdomina injiziert wurde, die gleichen Phänomene wie nach Injektion von Zellen dieser Linien, d.h. sie entwickelten aufgetriebene Abdomen und starben innerhalb von 5-8 Tagen. Offensichtlich gaben Zellen der genannten Linien Substanzen an das Medium ab, die auf den Empfänger toxisch wirkten.

Möglicherweise war die hohe Letalität der injizierten Weibchen und der Embryonen durch Viren bedingt, die im gebrauchten Medium der *Drosophila* Zell-Linien gefunden wurden (Picorna Virus nach Plus, persönliche Mitteilung). Viren und Virus-ähnliche Partikel wurden bei *Drosophila* in den Kernen und im Cytoplasma von Zellen nahezu aller untersuchter adulter Gewebe und vieler Zell-Linien beobachtet (Hirumi, 1976; Schneider und Blumenthal, 1978). Alte Fliegen und Fliegen, die unter ungünstigen Bedingungen gehalten werden, haben besonders hohe Titer an Virus-ähnlichen Partikeln (Schneider und Blumenthal, 1978). Da solche Partikel auch in larvalem Gewebe gefunden wurden (Hirumi, 1976), wird vermutet, daß Virus-ähnliche Partikel bzw. Viren bei *Drosophila* latent immer vorhanden sind und auch in der Keimbahn weitergegeben werden, daß sie jedoch erst dann stark vermehrt werden, wenn sich das Wirtstier in Streß-Situationen befindet. Das Zellwachstum von *Drosophila* Zell-Linien scheint durch die in den Zellen vorhandenen Virus-ähnlichen Partikel nicht beeinträchtigt zu werden (Schneider und Blumenthal, 1978). Denkbar ist, daß die Transplantation von Zellen in Embryonen oder adulte Tiere die Spenderzellen und die Empfänger in eine Streß-Situation versetzte, in der Viren oder Virus-ähnliche Partikel besonders stark vermehrt wurden und so den Wirt stark schädigen konnten.

Embryonen, denen Zellen älterer Zell-Linien injiziert wurden, hatten signifikant schlechtere Überlebenschancen als Empfänger von Zellen jüngerer Linien. Richard-Molard (1973) beobachtete, daß sich Primärkulturen von gegen sigma-Viren sensitiven und nicht-sensitiven *Drosophila*-Stämmen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Viren deutlich unterschieden, während die etablierten Zell-Linien der beiden Stämme etwa gleich hohe Virentiter aufwiesen. Möglicherweise entwickeln Zell-Linien mit fortschreitender Passagenzahl eine größere Empfindlichkeit gegenüber Viren und Virus-ähnlichen Partikeln. Hohe Virentiter könnten die Überlebenschancen embryonaler Empfänger drastisch verringern.

Die Zellen der im Transplantationstest verwendeten Zell-Linien teilten sich im Durchschnitt wesentlich langsamer als Zellen

der frühen embryonalen Entwicklungsphasen dies tun (Tabelle 3). Die Zell-Linien Sa₁, z spl₁, Hi₁ und 2/10₁ wiesen Verdoppelungszeiten auf von 2-4 Tagen, wohingegen im jungen Embryo Mitosen in rascher Folge - innerhalb von Minuten oder wenigen Stunden - ablaufen. Wenngleich die Invagination von Keimstreif sowie vorderer und hinterer Mitteldarmanlage anfänglich nicht von Mitosen begleitet wird, ist schon die folgende Entwicklungsphase der Keimstreifverlängerung durch rege Mitoseaktivität charakterisiert (Sonnenblick, 1950). Sich langsam teilende Zellen aus Kultur werden demnach durch Transplantation in frühe Embryonalstadien in eine Umgebung gebracht, die durch hohe Zellteilungsraten gekennzeichnet ist. Um nun den Zellen aus Kultur nach der Transplantation eine längere Anpassungszeit an die veränderten Bedingungen zu ermöglichen, wurden bei diesen Versuchsserien Präblastodermstadien als Empfänger gewählt. Daß Spenderzellen nach Transplantation ins Präblastoderm durchaus im Empfängergewebe integriert werden können, zeigten die Versuche mit Blastodermzellen.

Drosophila-Zellen aus Kultur, die in Präblastodermstadien transplantiert wurden, führten in keinem Tier zu Mosaikgewebe. Es konnte weder eine echte Integration dieser Spenderzellen im Empfängergewebe - nachzuweisen zum Beispiel durch positive Reaktion im Aldehyd-Oxidase Test -, noch eine autonome Entwicklung als Borsten oder Haare tragendes Implantat beobachtet werden. Wohl aber wurden in den Abdomina von Larven und Adulten vereinzelt Vesikel gefunden, die chitinösen Strukturen ähnelten und größer waren als die 1-3 Zellen, die implantiert worden waren (Abb. 70).

Nach Transplantation von Zellen der Linien Sa₁, z spl₁, Hi₁ und 2/10₁ ins Präblastoderm wurden etwa gleich hohe "Mosaikraten" beobachtet. Eine Ausnahme bildete die Unterlinie N₂ der Zell-Linie Sa₁ (39./40. Passage), für die die "Mosaikrate" um das zweieinhalbfache über dem Durchschnitt lag (Tabelle 23). In den Empfängern dieser Zellen fanden sich besonders häufig Vesikel, die Chitinstrukturen ähnelten (Abb. 70). Verhältnismäßig viele solcher Vesikel ließen sich auch nach Transplantation von Zellen der jungen Linie z spl₁ (11./12. Passage) beobachten. Bezüglich der Überlebensraten der Empfänger ergaben

sich für die beiden genannten Linien Parallelen. Die Transplantation von Zellen der jungen Zell-Linie $z\ spl_1$ führte zu Überlebensraten, die wenig unter den nach Transplantation von Blastodermzellen ins Präblastoderm beobachteten Überlebensraten lagen, und, verglichen mit den übrigen älteren Zell-Linien, hatte die Transplantation von Zellen der Linie Sa_1 , Unterlinie N_2 den geringsten Effekt auf die Überlebensraten der Empfänger (Tabellen 12-14). Außerdem hatten je zwei Larven aus den Transplantationsserien $z\ spl_1$ (11./12. Passage) und Sa_1/N_2 (39./40. Passage) Fremdgewebe in den Speicheldrüsen gezeigt (Abb. 68, 69). Möglicherweise hatten sich Zellen dieser Linien bzw. Unterlinien bis zum Zeitpunkt der Transplantation Eigenschaften embryonaler Zellen am ehesten bewahrt. Die Bildung chitinöser Vesikel im Empfänger könnte darüberhinaus bedeuten, daß Zellen dieser beiden Linien von embryonalen Zellen abstammten, die präsumptive Chitinzellen waren, und daß diese Determination in Kultur unvollkommen erhalten blieb.

Zellen dieser beiden Zell-Linien zeigten zwar auch ähnliches Wachstumsverhalten und ähnliche Morphologie (Abschnitt 3.1.2, Abb. 6, 8), doch hinsichtlich des Karyotyps ergab sich keine Übereinstimmung: Die Linie $z\ spl_1$ war überwiegend weiblich $\overline{XX} + Dp$ und diploid, während bei der fast reinen XY Linie Sa_1/N_2 zum Zeitpunkt der Transplantation 56% der Zellen tetraploid waren (Tabelle 2). Vergleicht man daneben die Transplantationsergebnisse der übrigen getesteten Zell-Linien hinsichtlich Morphologie, Karyotyp und Wachstum der Zellen, so zeigt sich, daß diese Eigenschaften der Zell-Linien für das Verhalten der Zellen nach Transplantation von untergeordneter Bedeutung sind.

Möglicherweise zeigten Zellen aus Kultur mit der Bildung von Chitinstrukturen-ähnlichen Vesikeln eine eingeschränkte Reaktion auf das Häutungshormon Ecdyson, dem sie im Empfänger ausgesetzt waren. Zumindest Zellen aus Primärkulturen können auf die Ecdysontiter in larvalen Empfängern reagieren und sich im Verlauf der Metamorphose zu adulten Chitinstrukturen differenzieren, wie Versuche von Dübendorfer et al. (1975) mit imaginalen Vesikeln aus Primärkulturen gezeigt haben. Diese imaginalen Vesikel können sich auch in vitro nach Ecdysonzugabe zu

kutikulären Strukturen mit Haaren und Borsten differenzieren (Dübendorfer et al., 1978; Milner und Dübendorfer, 1982).

Eine Reaktion auf in vitro Applikation von Ecdyson wurde auch für etablierte Zell-Linien von *Drosophila* beschrieben. 20-Hydroxy-Ecdysonzugabe zu Zellkulturen verursachte Veränderungen in der Morphologie der Zell-Linien; die Zellen der meisten untersuchten Linien formten Aggregate und stellten DNA-Synthese und Zellteilung ein (Courgeon, 1972, 1975); das Muster der Proteinsynthese wurde verändert und die Zellen einiger Linien zeigten erhöhte Mobilität (Berger et al., 1978, 1980, 1981). Für das Muster der Zelloberflächenproteine wurden ebenfalls Änderungen nach Ecdysonzugabe beschrieben (Johnson et al., 1983; Woods und Poodry, 1983). Courgeon (1972, 1975) beschrieb allerdings auch Zell-Linien, die nicht oder nur gering Ecdyson-sensitiv waren. Etablierte *Drosophila* Zell-Linien scheinen demnach nicht gleichartig auf Ecdyson zu reagieren. Ob zwischen der Empfindlichkeit gegenüber Ecdyson und der Abstammung der Zell-Linien von eventuell unterschiedlichen embryonalen Zellpopulationen ein Zusammenhang besteht, konnte bislang nicht geklärt werden.

Das Fremdgewebe, das sich bei einigen Larven der Transplantationsserien z spl₁ (11./12. Passage) und Sa₁/N₂ (39./40. Passage) in den Speicheldrüsen fand, wurde wohl kaum aus funktionsfähigen Speicheldrüsenzellen gebildet, denn es bestand aus einzelnen bräunlich dunklen Zellen, die in der lebenden Larve erkennbar waren. Diese dunklen Zellen glichen eher nekrotischem Material, wenngleich Chitinkomponenten nicht ganz auszuschliessen waren.

Bei einer Larve konnte zudem eine Wanderung dieses fremden Zellmaterials verfolgt werden und zwar aus abdominalen Bereichen in den anterioren Bereich der Speicheldrüsen. Ein gewisses Wanderungsvermögen des Fremdmaterials muß wohl gefordert werden, da sonst dessen Auftreten in den Speicheldrüsen kaum zu erklären wäre (die Kulturzellen wurden ausschließlich in den Hinterpol der Präblastodermempfänger transplantiert). Für die Blastodermzellen hingegen wurde auf Grund der Transplanta-

tionsergebnisse angenommen, daß sie im Empfänger nicht zu wandern vermögen, zumindest nicht über größere Entfernungen. Zellen aus Kultur würden sich demnach von Blastodermzellen in drei wichtigen Punkten unterscheiden: Nach Transplantation in frühe Embryonalstadien wurden deutlich verringerte Überlebensraten beobachtet, eine funktionelle Integration im Empfänger-gewebe konnte nicht nachgewiesen werden (die im Darm und larvalen Hypoderm beobachteten bräunlichen Bereiche entsprachen eher einer Einlagerung gewebefremden, vielleicht nekrotischen Materials) und schließlich scheinen die Kulturzellen im Empfänger wandern zu können.

Kerne von Zellen aus Kultur mögen sich nach Transplantation in frühe Embryonalstadien durchaus anders verhalten als ganze Zellen, wie die Versuche von Illmensee (1978) zeigten. Nach Transplantation von Zellkernen verschiedener *Drosophila* Zell-Linien in Furchungsstadien fanden sich Tiere mit Mosaikgewebe in larvalen inneren Organen - nachgewiesen durch Aldehyd-Oxidase-Reaktion - und in adulten abdominalen Chitinstrukturen. Die von Illmensee getesteten Zell-Linien waren von den in der vorliegenden Arbeit hergestellten und untersuchten Linien verschieden; nur Kerne von zwei der von ihm getesteten Linien vermochten an der Entwicklung in vivo teilzunehmen (Schneider's Linie 1 lieferte vorzugsweise larvales Gewebe und Echalié's Linie 52-84 differenzierte sich zu Adultstrukturen). Da Angaben zum Karyotyp der übrigen Zell-Linien fehlen, bleibt offen, ob die Zellen dieser Linien noch ein intaktes Genom besaßen. Wie sich aus diesen Versuchen schließen läßt, haben Kerne einzelner Zell-Linien die Potenz behalten, sich in ein normales Entwicklungsgeschehen einzufügen, Kerne anderer Zell-Linien verloren jedoch diese Potenz im Verlauf der in vitro Kultur. Zellen als ganze Einheiten scheinen dagegen weitaus stärker in ihrer Entwicklungspotenz eingeschränkt zu sein, wie die Ergebnisse der Zelltransplantationen nahelegen.

Das unterschiedliche Verhalten im Transplantationstest, wie es für Zellen und Kerne aus *Drosophila* Zell-Linien beobachtet wurde, könnte dadurch bedingt sein, daß sich die Zellen während der Periode der in vitro Kultur "differenzierten", ohne daß diese Differenzierung äußerlich sichtbar sein müßte. Sol-

che "differenzierten" Zellen würden von den embryonalen Empfängern möglicherweise nicht mehr als embryonale Zellen erkannt und daher nicht eingebaut. Die im Vergleich zum frühen Embryo geringe Teilungsaktivität der Kulturzellen mag dabei zusätzlich hemmend gewirkt haben. Die Linie 2/10₂, die unter den in der Transplantation getesteten Zell-Linien am langsamsten wuchs, erbrachte die niedrigste "Mosaikrate".

Für die Anlage der Zellkulturen wurden nicht Eier früher Embryonalstadien, wie zum Beispiel des Blastoderms, sondern Eier älterer Embryonalstadien (6-18 h) verwendet. Ein Großteil der Zellen dieser älteren Entwicklungsstadien ist bereits differenziert, mindestens aber stabil determiniert. Wie weit solche differenzierten Zellen aus älteren Embryonen nach Transplantation ins Blastoderm oder Präblastoderm im Empfängergewebe integriert würden, ist bislang unbekannt. Die einzige hier durchgeführte Versuchsserie mit Spenderzellen aus älteren Embryonalstadien als dem Blastoderm ergab, daß zumindest Zellen aus 5 - 5 1/2 h alten Embryonen nach Transplantation ins Blastoderm im Empfängergewebe integriert werden. Die im Mitteldarm des Empfängers integrierten Spenderzellen hatten vermutlich Mitteldarm-Qualität, da sie aus der posterioren Invagination von hinterer Mitteldarmanlage und Proctodäum stammten. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, Zellen aus fortgeschrittenen embryonalen Entwicklungsstadien sowie Zellen aus Primärkulturen auf ihre Integrationsfähigkeit in Blastoderm- oder Präblastodermempfängern zu testen.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mittels Zell- und Kerntransplantation festzustellen, welche Entwicklungspotenz embryonale Zellen und Kerne von *Drosophila melanogaster* besitzen. Genetisch markierte Spenderzellen und Spenderkerne wurden in verschiedene Regionen von Eiern verschiedener Entwicklungsstadien transplantiert. Die Spenderkerne stammten aus dem Präblastoderm. Als embryonale Spenderzellen dienten Zellen aus dem Blastodermstadium, und als mitotisch aktive, undifferenzierte und damit quasi embryonale Spenderzellen wurden Zellen aus Kultur verwendet. Die Zell-Linien wurden aus *Drosophila*-Embryonen neu angelegt, und ihre wichtigsten Eigenschaften wurden untersucht.

Morphologie, Chromosomenverhältnisse und Wachstum der zehn neu angelegten stabilen Zell-Linien von *Drosophila* wurden über einen Zeitraum von 2-3 Jahren beobachtet. Die Zell-Linien zeigten Unterschiede sowohl in der Zellmorphologie als auch in den Karyotypen. Zell-Linien mit überwiegend oder ausschließlich XX oder XY bzw. XO Chromosomen entwickelten sich neben solchen, die alle drei genannten Kombinationen der Geschlechtschromosomen in unterschiedlichen Anteilen aufwiesen. Die meisten Zell-Linien waren diploid, einige hatten hohe Anteile an tetraploiden Zellen. Das Wachstum der etablierten Zell-Linien war abhängig vom Alter der Embryonen, aus denen sie gewonnen wurden: Je älter die Embryonen waren, um so rascher wuchsen die Zellen der etablierten Linien, und je jünger die Embryonen waren, um so langsamer wuchsen die Zellen.

Bevor Zellen aus in vitro Kultur in frühe Entwicklungsstadien des *Drosophila*-Eies transplantiert wurden, war es wichtig, zu wissen, welche Entwicklungspotenz Kerne und Zellen aus Embryonalstadien (in vivo Kultur) nach Transplantation in Empfänger gleichen oder unterschiedlichen Entwicklungsstadiums zeigen. Spenderkerne aus dem Vorderpol von Präblastodermstadien wurden nach Transplantation in den Hinterpol von Furchungsstadien in verschiedenen abdominalen Organen der Empfänger integriert.

Wurden Präblastodermkerne in Polregionen von Eiern im Präblastoderm- oder Blastodermstadium transplantiert, wurde Integration von Spenderkernen nicht beobachtet.

Für alle Kern- und Zelltransplantationen gilt, daß Defektbildungen überwiegend in den larvalen und adulten Organen beobachtet wurden, deren Anlagebereiche im Blastoderm entsprechend den morphogenetischen Anlageplänen der Injektionsstelle benachbart liegen.

Blastodermzellen wurden in homotoper und heterotoper Transplantation auf ihre Entwicklungspotenz hin untersucht. Blastodermzellen aus dem Hinterpol bzw. Vorderpol wurden in die homotopen Regionen des Hinterpols bzw. Vorderpols von Empfängern im Blastodermstadium transplantiert. Es wurde Integration der Spenderzellen im Empfängergewebe und, wenn auch seltener, autonome Entwicklung in Form kleiner Implantate beobachtet. Integration von Spenderzellen wurde ausschließlich für Organe gefunden, deren Anlagebereiche im Blastoderm entsprechend den in der Literatur beschriebenen morphogenetischen Anlageplänen nahe der Empfängerregion liegen, die bei homotoper Transplantation identisch war mit der Spenderregion.

In heterotoper Transplantation wurden Blastodermzellen aus verschiedenen Regionen (Vorderpol bzw. Hinterpol, Ventral-, Lateral-, Dorsalregion in 0.66 Eilänge) entnommen und in den Hinterpol und den Vorderpol von Empfängern im Blastodermstadium transplantiert. Vorderpolzellen wurden darüber hinaus auch in die Eimitte transplantiert. Nach heterotoper Transplantation wurde ebenfalls Integration von Spenderzellen im Empfängergewebe wie auch autonome Entwicklung in Form von Implantaten beobachtet. Die Implantate wurden, soweit dies wegen der häufig geringen Größe der Strukturen möglich war, aufgrund der Färbung und der Form von Borsten und Haaren als von Spenderzellen abstammend klassifiziert. Die Implantate zeigten herkunftsgemäße Entwicklung. Damit ist anzunehmen, daß Blastodermzellen, die Chitinstrukturen liefern, stabil determiniert sind.

Nach heterotoper Transplantation wurde Integration von Spenderzellen vor allem im Darmgewebe beobachtet. Die wenigen Ausnahmen werden diskutiert. Die Häufigkeit, mit der Darmmosaiken auftraten, war abhängig von der jeweils gewählten Kombination der Spender- und Empfängerregionen: Heterotope Pol → Pol Transplantationen ergaben höhere Darmmosaikraten als Transplantationen aus dem Bereich O.66 Eilänge in den Hinterpol bzw. Vorderpol. Das Auftreten von Darmmosaiken nach heterotoper Transplantation beweist nicht, daß einige Blastodermzellen einer Region pluripotent sind. Dieser Befund ist vielmehr damit zu erklären, daß Organe, die sich über einen größeren Bereich des Keimes erstrecken, bereits im Blastoderm in verschiedenen Regionen angelegt werden. Ein Teil der Blastodermzellen aus den Polregionen stammt aus Darmanlagen und kann nach Transplantation in den Gegenpol wiederum in eine Darmanlage gelangen. Blastodermzellen aus dem Bereich O.66 Eilänge stammen dagegen mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit aus Darmanlagen; letztere sind entsprechend den Anlageplänen in dieser Region nicht vorhanden. Es ist daher anzunehmen, daß nicht nur Blastodermzellen, die Chitinstrukturen liefern, stabil determiniert sind, sondern auch solche, die Darmgewebe liefern.

Nach heterotoper Transplantation von Vorderpolzellen in die ventrale, laterale und dorsale Eimitte wurden Darmmosaiken beobachtet in einer Häufigkeit, die den heterotopen Pol → Pol Transplantationen entsprach. Geht man davon aus, daß alle Blastodermzellen einer Region stabil determiniert sind, Vorläuferzellen bestimmter Organe, wie z.B. des Darms, jedoch in verschiedenen Eiregionen vorhanden sind, dann können sich Blastodermzellen nach heterotoper Transplantation integrieren, wenn sie in Zellbereiche gelangen, die einen gleichen Determinationszustand besitzen. Demnach wären für die Eimitte Darmanlagen anzunehmen, in die prospektive Darmzellen aus dem Vorderpol integriert werden können. Nach den Anlageplänen existieren in der Eimitte keine Darmanlagen, so daß sich hier eine Diskrepanz ergibt, die diskutiert wird.

Zellen aus Kultur, die in den Hinterpol von Präblastodermstadien transplantiert wurden, integrierten sich nicht im Wirtsgewebe (Blastodermzellen können sich nach Transplantation in Präblastodermempfänger im Wirtsgewebe integrieren). Eine autonome Entwicklung von Borsten-tragenden Chitinstrukturen war gleichfalls nicht zu beobachten. Es wurden jedoch Tiere mit Spendermaterial gefunden, das in Form kleiner Vesikel frei im Abdomen lag; Zellen zweier Zell-Linien lieferten besonders häufig Vesikel, die Chitinstrukturen ohne Borsten und Haare ähnelten. Daneben fanden sich in den larvalen Speicheldrüsen, im larvalen und adulten Darm und im externen Abdomen von Larven und Adulten braune, möglicherweise nekrotisierte Zellbereiche. Zellen der im Transplantationsexperiment getesteten Zell-Linien können sich demnach nach Transplantation in frühe Embryonalstadien nicht mehr funktionsgemäß im Empfängergewebe integrieren.

Spenderzellen aus älteren Zell-Linien (höhere Passagenzahl) beeinflussten die Überlebensraten der Empfänger deutlich negativ, wohingegen die Überlebensraten der Empfänger von Spenderzellen aus jüngeren Zell-Linien (niedrige Passagenzahl) den Überlebensraten nach Blastodermzell-Transplantation vergleichbar waren. Ein möglicher Zusammenhang zwischen hoher Letalität der Empfänger und in den Zell-Linien etwa vorhandenen Viren wird diskutiert.

Danksagung

Herrn Professor Dr. G. Korge danke ich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und für die intensiv geführte Diskussion in deren Verlauf. Er war stets bereit, auf meine Fragen und Probleme bezüglich dieser Arbeit einzugehen und mir mit Anregungen und Hinweisen zu helfen.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit, die im Rahmen des Forschungsprogramms von Herrn Prof. Dr. G. Korge, KO 434/6 durchgeführt wurde.

5. Literaturverzeichnis

- Allis, C.D., Underwood, E.M., Caulton, J.H. und Mahowald, A.P. (1979). Pole cells of *Drosophila melanogaster* in culture. *Develop. Biol.* 69, 451-465.
- Barigozzi, C., Fraccaro, M. und Halfer, C. (1977). Heterochromatin in the 4th chromosome of *D. melanogaster*. *Caryologia* 30, 199-204.
- Berger, E., Ringler, R., Alahiotis, S. und Frank, M. (1978). Ecdysone-induced changes in morphology and protein synthesis in *Drosophila* cell cultures. *Develop. Biol.* 62, 498-511.
- Berger, E., Frank, M. und Abell, M.C. (1980). Ecdysone-induced changes in protein synthesis in embryonic *Drosophila* cells in culture. In: *Invertebrate Systems in Vitro* (eds. E. Kurstak, K. Maramorosch und A. Dübendorfer) 195-208. Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- Berger, E., Cox, G., Ireland, R. und Weber, L. (1981). Actin content and synthesis in differentiating *Drosophila* cells in culture. *J. Insect Physiol.* 27, 129-137.
- Bernhard, H.P., Lienhard, S. und Regenass, U. (1980). Isolation and characterization of mutant *Drosophila* cell lines. In: *Invertebrate Systems in Vitro* (eds. E. Kurstak, K. Maramorosch und A. Dübendorfer) 13-26. Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
- Bodenstein, D. (1950) The postembryonic development of *Drosophila*. In: *Biology of Drosophila* (ed. M. Demerec) 275-367. Wiley, New York.
- Bownes, M. und Sang, J.H. (1974). Experimental manipulations of early *Drosophila* embryos. II. Adult and embryonic defects resulting from the removal of blastoderm cells by pricking. *J. Embryol. exp. Morph.* 32, 273-285.
- Chan, L.-N. und Gehring, W. (1971). Determination of blastoderm cells in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2217-2221.
- Counce, S.J. (1963). Developmental morphology of polar granules in *Drosophila*. Including observations on pole cell behavior and distribution during embryogenesis. *J. Morph.* 112, 129-146.
- Counce, S.J. (1973). The causal analysis of insect embryogenesis. In: *Developmental Systems: Insects* (eds. S.J. Counce und C.H. Waddington), Vol. 2, 1-156. Academic Press, New York.

Courgeon, A.-M. (1972). Action of insect hormones at the cellular level. I. Morphological changes of a diploid cell line of *Drosophila melanogaster*, treated with ecdysone and several analogues in vitro. Exp. Cell Res. 74, 327-336.

Courgeon, A.-M. (1975). Action of insect hormones at the cellular level. II. Differing sensitivity to β -ecdysone of several lines and clones of *Drosophila melanogaster* cells. Exp. Cell Res. 94, 283-291.

Deák, J.J. (1977). Detection of clones in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Arch. 183, 165-170.

Deák, J.J. (1980). Embryogenesis in *Drosophila*: Can a single mechanism explain the developmental segregation of germ-line and somatic cells and this subsequent determination? Wilhelm Roux's Arch. 188, 179-185.

Dickinson, W.J. (1970). The genetics of aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*. Genetics 66, 487-496.

Dickinson, W.J. (1971). Aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*: A system for genetic studies on developmental regulation. Develop. Biol. 26, 77-86.

Dickinson, W.J. und Sullivan, D.T. (1975). Gene-Enzyme Systems in *Drosophila*. Springer, Berlin, New York.

Dolfini, S. (1971). Karyotype polymorphism in a cell population of *Drosophila melanogaster* cultured in vitro. Chromosoma 33, 196-208.

Dübendorfer, A., Shields, G. und Sang, J.A. (1975). Development and differentiation in vitro of *Drosophila* imaginal disc cells from dissociated early embryos. J. Embryol. exp. Morph. 33, 487-498.

Dübendorfer, A., Blumer, A. und Deák, J.J. (1978). Differentiation in vitro of larval and adult muscles from embryonic cells of *Drosophila*. Wilhelm Roux's Arch. 184, 233-249.

Echalier, G. und Ohanessian, A. (1970). In vitro culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cells. In Vitro 6, 162-172.

Faccio Dolfini, S. (1974). Spontaneous chromosome rearrangements in an established cell line of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 47, 253-261.

Folkman, J. und Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345-349.

Fullilove, S.L. und Jacobson, A.G. (1978). Embryonic development: Descriptive. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (eds. M. Ashburner und T.R.F. Wright) Vol. 2c, 105-227. Academic Press, New York.

Garcia-Bellido, A. und Merriam, J.R. (1969). Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila gynandromorphs*. *J. exp. Zool.* 170, 61-76.

Garcia-Bellido, A. und Ripoll, P. (1978). Cell lineage and differentiation in *Drosophila*. In: *Genetic Mosaics and Cell Differentiation* (ed. W.J. Gehring) 119-156. Springer, Berlin, New York.

Gateff, E. (1978). Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 200, 1448-1459.

Chysen, A., Janson, R. und Santamaria, P. (1983). Segmental determination of sensory neurons in *Drosophila*. *Develop. Biol.* 99, 7-26.

Gräßman, A. (1970). Mikrochirurgische Zellkerntransplantation bei Säugetierzellen. *Exp. Cell Res.* 60, 373-382.

Halfer, C. (1978). Karyotypic Evolution in an originally XY cell line of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 68, 149-163.

Hirumi, H. (1976). Viral, microbial, and extrinsic cell contamination of insect cell cultures. In: *Invertebrate Tissue Culture* (ed. K. Maramorosch), 233-268. Academic Press, New York.

Hochman, B. (1973). Analysis of a whole chromosome in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposium on quantitative Biology* 36, 581-589.

Hochman, B. (1976). The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (eds. M. Ashburner und E. Novitski) Vol. 15, 903-928. Academic Press, New York.

Howland, R.B. und Child, G.P. (1935). Experimental studies on development in *Drosophila melanogaster*. I. Removal of protoplasmic materials during late cleavage and early embryonic stages. *J. exp. Zool.* 70, 415-427.

Howland, R.B. und Sonnenblick, B.P. (1936). Experimental studies on development in *Drosophila melanogaster*. II. Regulation in the early egg. J. exp. Zool. 73, 109-123.

Illmensee, K. (1972). Developmental potencies of nuclei from cleavage, preblastoderm, and syncytial blastoderm transplanted into infertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Arch. 170, 267-298.

Illmensee, K. (1973). The potentialities of transplanted early gastrula nuclei of *Drosophila melanogaster*. Production of their imago descendants by germ-line transplantation. Wilhelm Roux's Arch. 171, 331-343.

Illmensee, K. (1976). Nuclear and cytoplasmic transplantation in *Drosophila*. In: Insect Development (ed. P.A. Lawrence) 76-96. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Illmensee, K., Mahowald, A.P. und Loomis, M.R. (1976). The ontogeny of germ plasm during oogenesis in *Drosophila*. Develop. Biol. 49, 40-65.

Illmensee, K. (1978). *Drosophila* chimeras and the problem of determination. In: Genetic Mosaics and Cell Differentiation (ed. W.J. Gehring) 51-69. Springer, Berlin, New York.

Janning, W. (1974). Entwicklungsgenetische Untersuchungen an Gynandern von *Drosophila melanogaster*. I. Die inneren Organe der Imago. Wilhelm Roux's Arch. 174, 313-332.

Janning, W. (1975). Entwicklungsgenetische Untersuchungen an Gynandern von *Drosophila melanogaster*. III. Einige Beobachtungen an larvalen Gynandern. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1974, 134-138.

Janning, W. (1976). Entwicklungsgenetische Untersuchungen an Gynandern von *Drosophila melanogaster*. IV. Vergleich der morphogenetischen Anlagepläne larvaler und imaginaler Strukturen. Wilhelm Roux's Arch. 179, 349-372.

Johnson, T.K., Brown, L.A. und Denell, R.E. (1983). Changes in cell surface proteins of cultured *Drosophila* cells exposed to 20-hydroxyecdysone. Roux's Arch. Dev. Biol. 192, 103-107.

Kakpakov, V.T., Gvozdev, A.A., Platova, T.P. und Polukarova, L.G. (1969). In vitro establishment of embryonic cell lines of *Drosophila melanogaster*. Soviet Genetics 5, 1647-1655.

- Kankel, D.R. und Hall, J.C. (1976). Fate mapping of nervous system and other internal tissues in genetic mosaics of *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 48, 1-24.
- Kauffman, S.A. (1980). Heterotopic transplantation in the syncytial blastoderm of *Drosophila*: Evidence for anterior and posterior nuclear commitments. *Wilhelm Roux's Arch.* 189, 135-145.
- Kuhn, D.T. und Cunningham, G.N. (1978). Aldehyde oxidase distribution in *Drosophila melanogaster* mature imaginal discs, histoblasts and rings of imaginal cells. *J. exp. Zool.* 204, 1-10.
- Kuhn, D.T., Fogerty, S.C., Eskens, A.A.C und Sprey, Th.E. (1983). Developmental compartments in the *Drosophila melanogaster* wing disc. *Develop. Biol.* 95, 399-413.
- Lawrence, P.A. und Morata, G. (1977). The early development of mesothoracic compartments in *Drosophila*, *Develop. Biol.* 56, 40-51.
- Lindsley, D.L. und Grell, E.H. (1968). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst. Washington. Publ. No.* 627.
- Lohs-Schardin, M., Sander, K., Cremer, C., Cremer, T. und Zorn, C. (1979a). Localized ultraviolet laser microbeam irradiation of early *Drosophila* embryos: Fate maps based on location and frequency of adult defects. *Develop. Biol.* 68, 533-545.
- Lohs-Schardin, M., Cremer, C. und Nüsslein-Volhard, C. (1979b). A fate map for the larval epidermis of *Drosophila melanogaster*: Localized cuticle defects following irradiation of the blastoderm with an ultraviolet laser microbeam. *Develop. Biol.* 73, 239-255.
- Madhavan, M.M. und Schneiderman, H.A. (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch.* 183, 269-305.
- Mahowald, A.P. (1962). Fine structure of pole cells and polar granules in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 151, 201-215.
- Marsh, J.L. und Wieschans, E. (1977). Germ-line dependence of the maroon-like maternal effect in *Drosophila*. *Develop. Biol.* 60, 396-403.
- Merriam, J.R. (1978). Estimating primordial cell numbers in *Drosophila* imaginal discs and histoblasts. In: *Genetic Mosaics and Cell Differentiation* (ed. W.J. Gehring) 71-96. Springer, Berlin, New York.

Mertens, M. (1977). Larval and imaginal defects after pricking of blastoderm stages: Experiments complementary to morphogenetic fate maps of *Drosophila*. *Dros. Inf. Serv.* 52, 134-135.

Milner, M.J. und Dübendorfer, A. (1982). Tissue-specific effects of the juvenile hormone analogue ZR 515 during metamorphosis in *Drosophila* cell cultures. *J. Insect Physiol.* 28, 661-666.

Mosna, G. und Dolfini, S. (1972). Morphological and chromosomal characterization of three new continuous cell lines of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 38, 1-9.

Newman, S.M. Jr. und Schubiger, G. (1980). A morphological and developmental study of *Drosophila* embryos ligated during nuclear multiplication. *Develop. Biol.* 79, 128-138.

Okada, M., Kleinman, J.A. und Schneiderman, H.A. (1974). Chimeric *Drosophila* adults produced by transplantation of nuclei into specific regions of fertilized eggs. *Develop. Biol.* 39, 286-294.

Okada, M., Komatsu, H. und Okumura, M. (1980). Behavior of interphase embryonic nuclei transplanted in nuclear multiplication stage embryos of *Drosophila melanogaster*. *Develop., Growth and Differ.* 22, 599-610.

Poulson, D.F. (1950). Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*, Meigen. In: *Biology of Drosophila* (ed. M. Demerec) 168-274. Wiley, New York.

Poulson, D.F. und Waterhouse, D.F. (1960). Experimental studies on pole cells and midgut differentiation in *Diptera*. *Australian J. Biol. Sci.* 13, 541-567.

Rabinowitz, M. (1941). Studies on the cytology and early embryology of the egg of *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.* 69, 1-49.

Richard-Molard, C. (1973). Etude de la multiplication du virus sigma dans plusieurs cultures primaires et dans une lignée continue de cellules de *Drosophila* issues d'embryons perpétuant un virus sigma défectif. *C.R. Acad. Sci (Paris)* D. 277, 121-124.

Rickoll, W.L. (1976). Cytoplasmic continuity between embryonic cells and the primitive yolk sac during early gastrulation in *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.* 49, 304-310.

Rickoll, W.L. und Counce, S.J. (1980). Morphogenesis in the embryo of *Drosophila melanogaster* - Germ band extension. Wilhelm Roux's Arch. 188, 163-177.

Ripoll, P. (1972). The embryonic organization of the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Arch. 169, 200-215.

Santamaria, P. (1975). Transplantation of nuclei between eggs of different species of *Drosophila*. Wilhelm Roux's Arch. 179, 89-98.

Santamaria, P. (1983). Analysis of haploid mosaics in *Drosophila*. Develop. Biol. 96, 285-295.

Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. Exp. Morph. 27, 353-365.

Schneider, I. und Blumenthal, A.B. (1978). *Drosophila* cell and tissue culture. In: The Genetics and Biology of *Drosophila* (eds. M. Ashburner und T.R.F. Wright) Vol. 2a, 265-315. Academic Press, New York.

Shields, G. und Sang, J.A. (1970). Characteristics of five cell types appearing during in vitro culture of embryonic material from *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. exp. Morph. 23, 53-69.

Shields, G. und Sang, J.A. (1977). Improved medium for culture of *Drosophila* embryonic cells. Dros. Inf. Serv. 52, 161.

Shields, G., Dübendorfer, A. und Sang, J.A. (1975). Differentiation in vitro of larval cell types from early embryonic cells of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. exp. Morph. 33, 159-175.

Simcox, A. und Sang, J.A. (1982). Cell determination in the *Drosophila melanogaster* embryo. In: Embryonic Development, Part A: Genetic aspects, 349-361. Liss Inc., New York.

Simcox, A. und Sang, J.A. (1983). When does determination occur in *Drosophila* embryos? Develop. Biol. 97, 212-221.

Sonnenblick, B.P. (1950). The early embryology of *Drosophila melanogaster*. In: Biology of *Drosophila* (ed. M. Demerec) 62-167. Wiley, New York.

Sprey, Th.E. (1977). Aldehyde oxidase distribution in the imaginal discs of some diptera. Wilhelm Roux's Arch. 183, 1-15.

Steiner, E. (1976). Establishment of compartments in the developing leg imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Arch. 180, 9-30.

Szabad, J., Schüpbach, T. und Wieschaus, E. (1979). Cell lineage and development in the larval epidermis of *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 73, 256-271.

Tsang, K.R. und Brooks, M.A. (1980). Dose response of insects to malignant transformed cells. In Vitro 16, 469-474.

Turner, F.R. und Mahowald, A.P. (1976). Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis. I. The Structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm. Develop. Biol. 50, 95-108.

Turner, F.R. und Mahowald, A.P. (1977). Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis. II. Gastrulation and segmentation. Develop. Biol. 57, 403-416.

Underwood, E.M., Turner, F.R. und Mahowald, A.P. (1980). Analysis of cell movements and fate mapping during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 74, 286-301.

Van Deusen, E.B. (1976). Sex determination in germ line chimeras of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. exp. Morph. 37, 173-185.

Wieschaus, E. (1978). Cell lineage relationships in the *Drosophila* embryo. In: Genetic Mosaics and Cell Differentiation (ed. W.J. Gehring) 97-118. Springer, Berlin, New York.

Wieschaus, E. und Gehring, W. (1976). Clonal analysis of primordial disc cells in the early embryo of *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 50, 249-263.

Woods, D.F. und Poodry, C.A. (1983). Cell surface proteins of *Drosophila*. Develop. Biol. 96, 23-31.

Zalokar, M. (1971). Transplantation of nuclei in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1539-1541.

Zalokar, M. (1973). Transplantation of nuclei into the polar plasm of *Drosophila* eggs. Develop. Biol. 32, 189-193.

Zalokar, M. und Erk, J. (1976). Division and migration of nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. J. Microscopie Biol. Cell. 25, 97-106.

Lebenslauf

- 14.04.1947 Geboren in Kißlegg im Allgäu
Eltern: Josef Huber und Maria Huber, geb. Braun,
Waltershofen
- 1953 - 1963 Besuch der Volksschule in Waltershofen sowie der
Staatlichen Handelsschule in Wangen im Allgäu
- 1963 - 1968 Buchhalterin in Steuerberatungsbüro und Aus-
bildung zur Damenschneiderin; Vorbereitung auf
das Abitur im Fernlehrunterricht durch Akade-
mikergesellschaft, München
- Juli 1968 Abitur am Maria-Theresia-Gymnasium, München
- ab WS 1968/69 Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Uni-
versität, München
- SS 1971 Diplom-Vorprüfung in Biologie
- WS 1971/72 Studium am Reed College, Portland, USA
- SS 1972
- SS 1973 Diplom-Biologen-Hauptprüfung (Mündlicher Teil)
an der LMU München
- WS 1973/74 Diplomarbeit bei Prof. Dr. H.J. Becker, Zoologi-
- WS 1975/76 sches Institut der LMU: Larvale und imaginale
Defekte nach Eingriffen am Blastoderm, Versuche
zur Ergänzung morphogenetischer Anlagepläne von
Drosophila
- WS 1976/77 Promotionsstudium bei Prof. Dr. H.J. Becker
- SS 1978 (1978 Übernahme eines Lehrstuhls an der Uni-
versität Wien durch Prof. Dr. H.J. Becker)
- ab WS 1978/79 Promotionsstudium bei Prof. Dr. G. Korge, Zoo-
logisches Institut der LMU, seit 1981 Institut
für Genetik der Freien Universität Berlin
- 1976 Heirat mit Dipl.Ing. Karl Mertens, München
- 1980 Geburt der Tochter Cordula
- 1983 Geburt des Sohnes Adrian

